

Philipps



Universität
Marburg

ptOmp85 – ein Toc75-Homolog in der dritten
Plastidenmembran von *Phaeodactylum tricornutum*

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lars Bullmann
aus Velbert

Marburg an der Lahn
Januar 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am 05.02.2010

Prüfungskommission:

Prof. Dr. Uwe G. Maier (Erstgutachter)

Prof. Dr. Klaus Lingelbach (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Regine Kahmann

Prof. Dr. Andreas Brune

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2010

"Wonderful! We are now a part of the tribe."
(C-3PO)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Bullmann L, Haarmann R, Mirus O, Bredemeier R, Hempel F, Maier UG & Schleiff E (2010)
Filling the gap: the evolutionary conserved Omp85 in plastids of chromalveolates.
J Biol Chem, 285 (9), 6848-6856

Weitere Artikel:

Hempel F, **Bullmann L**, Lau J, Zauner S & Maier UG (2009)
ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms.
Mol Biol Evol, 26, 1781-1790.

Übersichtsartikel:

Bolte K, **Bullmann L**, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG. (2009)
Protein Targeting into Secondary Plastids.
J Eukaryot Microbiol, 56, 9-15.

Inhaltsübersicht

Publikationen	iv
Inhaltsübersicht	v
Inhalt	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung.....	18
3 Material	19
4 Methoden.....	23
5 Ergebnisse	45
6 Diskussion.....	72
7 Ausblick	88
8 Zusammenfassung	90
9 Referenzen.....	91
10 Anhang.....	102
Danksagung.....	107
<i>Curriculum vitae</i>.....	109
Erklärung.....	110

Inhalt

Publikationen	iv
Inhaltsübersicht	v
Inhalt	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung	1
1.1 Phototrophe Eukaryoten	1
1.1.1 Die Entstehung primärer Plastiden durch primäre Endosymbiose.....	1
1.2 Entstehung komplexer Plastiden durch sekundäre Endosymbiose	3
1.2.1 Die Architektur der komplexen Plastiden der Chromalveolaten	6
1.3 Plastidärer Proteinimport.....	7
1.3.1 Proteinimport in primäre Plastiden	7
1.3.2 Proteinimport in komplexe Plastiden der Chromalveolaten	12
2 Zielsetzung.....	18
3 Material	19
3.1 Chemikalien und Reagenzien	19
3.2 Enzyme	19
3.3 Molekularbiologische Kits	19
3.4 Filter und Membranen	19
3.5 Photobedarf.....	20
3.6 Antikörper.....	20
3.7 Geräte	20
3.7.1 Zentrifugen	20
3.7.2 Zubehör für Agarose-Gelelektrophorese.....	20
3.7.3 Zubehör für SDS – Poly-Acrylamidgelelektrophorese	20
3.7.4 Weitere Geräte.....	21
3.8 Organismen.....	21
3.9 Vektoren	21

3.10	Gelelektrophorese-Längenstandards	22
3.10.1	DNA-Längenstandards.....	22
3.10.2	Proteinmolekulargewichtsstandards.....	22
3.11	Oligonukleotide	22
4	Methoden.....	23
4.1	<i>In silico</i> -Analysen.....	23
4.1.1	Genom-, Nukleinsäure- und Proteindatenbanken	23
4.1.2	Proteinsequenzanalyseprogramme	24
4.1.3	Dreidimensionale Proteinmodellierung.....	24
4.1.4	Phylogenetische Analyse.....	25
4.2	Stamm- und Kulturhaltung	25
4.2.1	Stamm- und Kulturhaltung von <i>Escherichia coli</i>	25
4.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
4.2.3	Stamm- und Kulturhaltung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	26
4.3	Nukleinsäureanalytik.....	27
4.3.1	Isolierung von gesamt-DNA aus <i>P. tricornutum</i>	27
4.3.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	27
4.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>P. tricornutum</i>	28
4.3.4	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	28
4.3.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	29
4.3.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	29
4.3.7	Modifikation von Nukleinsäuren	29
4.3.8	Transformationen und Transfektionen	30
4.3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
4.3.10	Herstellung von copyDNA (cDNA).....	31
4.3.11	DNA-Sequenzierung mittels <i>Cycle-Sequencing</i>	32
4.4	Proteinanalytik.....	34
4.4.1	Herstellung von nativem Proteingestamtextrakt aus <i>P. tricornutum</i>	34
4.4.2	Fraktionierung von nativem Proteingestamtextrakt	34
4.4.3	Denaturierende Proteinfällung mit Tri-Chloressigsäure (TCA).....	35
4.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz.....	36
4.4.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
4.4.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	37

4.4.7	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und Immunodetektion (Western Blot).....	37
4.4.8	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Hexa-Histidin- (6His-) Fusionsproteinen	38
4.4.9	Rekonstitution von Kanalproteinen in Proteoliposomen	40
4.5	Weitere Methoden	41
4.5.1	Elektrophysiologische Messungen an rekonstituierten Membranproteinen in artifiziellen Biomembranen.....	41
4.5.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	44
5	Ergebnisse	45
5.1	<i>In silico</i> -Analyse.....	45
5.1.1	Die Analyse der Primärsequenz von ptOmp85 impliziert eine stromale Lokalisation	45
5.1.2	Modellierung eines dreidimensionalen Proteinmodells	46
5.1.3	ptOmp85-Homologe können in anderen Chromalveolaten identifiziert werden	47
5.1.4	Die Omp85-Homologen der Chromalveolaten zeigen Verwandtschafts-beziehungen zu Omp85-Proteinen des Toc75-Typs.....	47
5.2	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Lokalisationsstudien.....	49
5.2.1	ptOmp85 lokalisiert in der komplexen Plastiden von <i>P. tricornutum</i>	49
5.2.2	ptOmp85 ist ein integrales Membranprotein.....	51
5.2.3	ptOmp85 zeigt einen intraorganellären zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus	52
5.2.4	Das intraorganelläre Zielsteuerungssignal bewirkt heterolog die Relokalisierung stromaler Proteine	56
5.2.5	Experimente mit dem <i>self-assembling split GFP</i> -System zur Klärung der ptOmp85-Topologie	56
5.3	Elektrophysiologische Analysen	67
5.3.1	ptOmp85 bildet eine Pore in artifiziellen Biomembranen mit vergleichbaren Eigenschaften wie Toc75	67
6	Diskussion.....	72
6.1	Die <i>in silico</i> Analyse von ptOmp85 bestätigt die Zugehörigkeit zur Omp85-Familie und impliziert die Verwandtschaft zu Toc75-Proteinen.....	72
6.2	ptOmp85 ist ein integrales Protein der drittäußersten Plastidenmembran	74

6.3	Die elektrophysiologischen Messungen bestätigen die Toc75-artigen Eigenschaften von ptOmp85	85
6.4	ptOmp85 – Der Proteintranslokator der drittäußersten Plastidenmembran?.....	86
7	Ausblick	88
8	Zusammenfassung	90
9	Referenzen	91
10	Anhang.....	102
10.1	Oligonukleotide	102
10.2	Proteinidentifikationsnummern	104
10.3	Sequenzvergleich der IMS-lokalisierten pl-SP1-Homologen aus <i>P. tricornutum</i> und <i>A. thaliana</i>	105
10.4	Vektorkarten	106
	Danksagung.....	107
	<i>Curriculum vitae</i>	109
	Erklärung	110

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

In dieser Arbeit wurden soweit möglich Einheiten gemäß dem Internationalen Einheitensystem (*Système international d'unités*; SI) verwendet.

p	Pico (10^{-12})
n	Nano (10^{-9})
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
k	Kilo (10^3)

Nicht-SI-Einheiten

Bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius; $0^{\circ}\text{C} = -273$ Kelvin
Da	Dalton; $1 \text{ Da} = 1,6601 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
OD	Optische Dichte
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
U	<i>Unit</i> Einheit für Enzymaktivität

Symbole

α	griech. alpha; Symbol für helicale Proteinstrukturen
β	griech. beta; Symbol für Faltblatt-Proteinstrukturen
γ	griech. gamma
Δ	griech. Delta; 1. Deletionsmutation; 2. Differenz
λ	griech. lambda; Wellenlänge
\approx	ungefähr gleich
\sim	ungefähr
'	Minute
''	Sekunde
%	Prozent
[]	Werte in eckigen Klammern geben Konzentrationen an

Abkürzungen

aa	<i>amino acid(s)</i> (Aminosäure(n))	P	Permeabilität
APS	Ammoniumpersulfat	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
BTS	<i>Bipartite targeting sequenz</i> (zweigeteilte Zielsteuerungssequenz)	POTRA	Polypeptidtransport-assoziiert
(c)ER	(chloroplastidäres) Endoplasmatisches Retikulum	PPC	<i>peiplastidal compartment</i> (Periplastidäres Kompartiment)
CTAB	Cetyltrimethylammonium- bromid	PPM	<i>peiplastidal membrane</i> (Periplastidäre Membran)
e	Eulert'sche Zahl	R	universelle Gaskonstante
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
EST	<i>expressed sequence tag</i>	SP	Signalpeptid
F	Faraday-Konstante	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
F _c	<i>Fragment crystallized</i> Konstanter Teil von Immun- globulinen	Tic	<i>Translocon of the inner chloroplast membrane</i> (Translokone der inneren Chloroplastenmembran)
FL	<i>full length</i> (volle Länge)	Toc	<i>Translocon of the outer chloroplast membrane</i> (Translokone der äußeren Chloroplastenmembran)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein	Tom	<i>Translocon of the outer mitochondrial membrane</i> (Translokone der äußeren Mitochondrienmembran)
H ₂ O _{dest}	H ₂ O, destilliert	TP	Transitpeptid
H ₂ O _{bid}	H ₂ O, bidestilliert	Triton-X-100	Octophenolpoly (ethylen- glycolether) _n
IgG	Immunglobulin G	ü. N.	über Nacht
IMS	<i>intermembrane space</i> (Intermembranraum)	UV	Ultraviolett
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thio- galactopyranosid	Vol.	Volumen
KLSM	Konfokale(s) Laser-scanning Mikroskop(ie)	w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
Omp	<i>outer membrane protein</i> (Protein der äußeren (Bakterien-) Membran)	WT	Wildtyp
ORF	<i>Open reading Frame</i> (offener Leserahmen)		

1 Einleitung

1.1 Phototrophe Eukaryoten

Das charakteristische, vereinheitlichende Organell photoautotropher Eukaryoten ist die Plastide. Plastiden sind jedoch keine originär eukaryote Erfindung, sondern stammen vielmehr von vormals freilebenden, prokaryoten, phototrophen Vorläuferorganismen ab.

Bereits 1883 beschrieb Schimper Ähnlichkeiten bei der Teilung von Cyanobakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen (Schimper, 1883). 1905 formulierte dann Mereschkowsky erstmals ausführlich in seiner Arbeit „Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche“ die Grundidee der Entstehung von Plastiden aus endocytisierten Cyanobakterien (Mereschkowsky, 1905).

Erst zu Beginn der 1960er Jahre wurde diese Idee wieder aufgegriffen, als verschiedene Studien die Präsenz einer eigenen Organellen-DNA nachwiesen (Stocking & Gifford, 1959; Ris & Plaut, 1962; Chun *et al.*, 1963). 1967 formulierte schließlich Lynn Margulis die Endosymbiontentheorie in ihrer noch heute gültigen Form (Sagan, 1967).

1.1.1 Die Entstehung primärer Plastiden durch primäre Endosymbiose

Gemäß der Endosymbiontentheorie entstanden photoautotrophe Eukaryoten erstmals vor ca. 1,5 Mrd. Jahren durch die Endocytobiose eines ancestralen Cyanobakterium durch eine heterotrophe eukaryote Wirtszelle (Yoon *et al.*, 2004). Demnach wurde das endocytisierte Cyanobakterium nicht verstoffwechselt, sondern stattdessen stabil in den Corpus der Wirtszelle integriert. Diese Integration ging einher mit enormen Umstrukturierungen sowohl des Wirtes, vor allem aber des Cyanobakteriums, so dass sich über mehrere Entwicklungsstufen aus einem fakultativen Endosymbionten über das Stadium eines obligaten Endosymbionten schließlich das semi-autonome Organell in seiner heutigen Form entwickelte: die Plastide. Gekennzeichnet ist diese Entwicklung zum einen durch morphologische Reduktionen; so besitzen beispielsweise die meisten Plastidentypen heutzutage keine bakterielle Zellwand mehr. Vor allem aber Reduktionen auf genetischer Ebene waren ursächlich für die stabile Etablierung der Endosymbiose. So wurden zahlreiche Gene des Endosymbionten im Laufe der Evolution eliminiert, die für eine intrazelluläre Lebensweise nicht essentiell waren, und weiterhin ein beträchtlicher Teil Protein-codierender Gene in das Kerngenom des Wirtes transferiert (Martin & Herrmann, 1998; Palenik, 2002).

Der cyanobakterielle Ursprung rezenter primärer Plastiden wird noch heute deutlich unter anderem an der zirkulären Struktur des plastidären Genoms (Manning *et al.*, 1971) und am Translationsapparat mit bakteriellen 70S-Ribosomen (Boardman *et al.*, 1966). Zudem sind primäre Plastiden von einer Doppelmembran umgeben. Die innere Membran scheint hierbei aufgrund ihrer Lipidkomposition cyanobakteriellen Ursprungs zu sein (Cavalier-Smith, 2000). Die äußere Membran besitzt sowohl pro- als auch eukaryote Charakteristika, und könnte daher aus der Verschmelzung der äußeren Bakterienmembran und der vermutlich ursprünglich umgebenden Membran der phagotrophen Vakuole des Wirtes hervorgegangen sein (Bölter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999).

Der Ursprung primärer Plastiden scheint monophyletischer Natur zu sein, das heißt, alle rezenten primären Plastiden stammen von einem singulären primären Endosymbioseereignis ab (Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2005). Von diesem Ereignis ausgehend entwickelten sich demnach die drei rezenten Linien der Archaeplastida: die Glaucophyta, die noch recht ursprüngliche Plastiden („Cyanellen“) mit Resten einer cyanobakteriellen Zellwand zwischen äußerer und innerer Membran besitzen, die Rhodophyta (Rotalgen), deren Plastiden aufgrund der charakteristischen Pigmentierung auch Rhodoplasten genannt wird, und die Chlorophyta (Grünalgen), aus denen sich im weiteren Verlauf die Landpflanzen entwickelten (siehe Abb. 1-1).

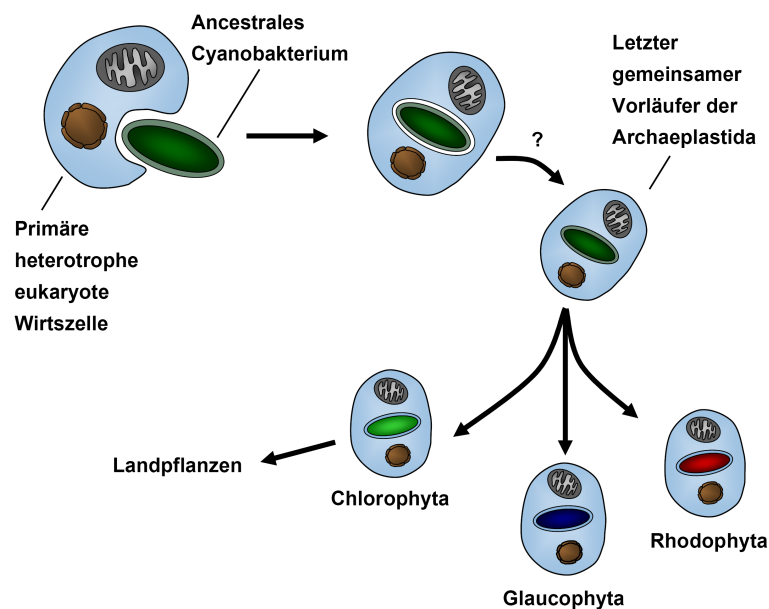


Abb. 1-1: Die Entstehung primärer Plastiden durch primäre Endosymbiose

Die Endosymbiontentheorie postuliert, dass die rezenten Vertreter der Archaeplastida (Rhodophyten, Glaucophyten, Chlorophyten und die daraus hervorgegangenen Landpflanzen) monophyletischen Ursprungs sind, also das Produkt eines singulären primären Endocytobioseereignisses zwischen einem ancestralen Cyanobakterium und einer heterotropen eukaryoten Wirtszelle.

Seit kurzem ist bekannt, dass die sogenannten Chromatophore der photoautotrophen Thekamöbe *Paulinella chromatophora* ebenfalls Resultat einer, von den Archaeplastida unabhängigen, primären Endosymbiose sind (Marin *et al.*, 2005). Inwiefern diese allerdings schon final den Status eines echten semi-autonomen Organells erlangt haben, oder noch als obligate Endosymbionten angesehen werden müssen, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. So konnte zwar inzwischen nachgewiesen werden, dass ein Transfer mindestens eines endosymbiontischen Gens in das Wirtsgenom stattgefunden hat, es ist aber unklar, ob das entsprechende Genprodukt auch tatsächlich in die Chromatophore reimportiert wird (Nakayama & Ishida, 2009).

1.2 Entstehung komplexer Plastiden durch sekundäre Endosymbiose

Neben den oben beschriebenen primären Plastiden der Glaucophyten, Rhodophyten und Chlorophyten finden sich darüber hinaus weitere Plastidentypen, die morphologisch deutlich vom primären Typ abweichen. Auffälligstes Merkmal dieser Plastiden sind zusätzliche Hüllmembranen; so kennt man Plastidentypen mit drei und vier umgebenden Membranen.

Diese sind das Resultat einer sekundären Endosymbiose. Hierbei wurde eine ancestrale phototrophe eukaryote Zelle mit primärer Plastide ihrerseits von einer eukaryoten Wirtszelle phagozytiert, und, wie im Fall der primären Plastiden, als semi-autonomes Organell stabil etabliert (Stoebe & Maier, 2002).

Wie vergleichende Sequenzanalysen verschiedener Plastome sekundärer Plastiden zeigen, handelt es sich bei der sekundären Endosymbiose, anders als bei der primären, nicht um ein monophyletisches, sondern um ein polyphyletisches Ereignis (Van de Peer *et al.*, 1996; Douglas & Penny, 1999; Rogers *et al.*, 2007). Dies bedeutet, dass die unterschiedlichen Taxa mit sekundären Plastiden nicht auf ein singuläres Endocytobioseereignis von einem Wirt und einem Symbionten zurückzuführen sind. Stattdessen haben sich die heute bekannten komplexen Plastiden aus mindestens drei unabhängigen sekundären Endocytobioseereignissen entwickelt. Bei zwei dieser Ereignisse war der Endosymbiont eine Chlorophyte (Rogers *et al.*, 2007). Hieraus entwickelten sich die beiden Gruppen der Euglenophyta und der Chlorarachniophyta, die gemeinsam in der sogenannten „Grünen Linie“ zusammenfasst werden. Vertreter dieser beiden Gruppen besitzen komplexe Plastiden die von drei (Euglenophyta) bzw. vier Membranen (Chlorarachniophyta) umgeben sind. Eine dritte Gruppe bilden die sogenannten Chromalveolaten. Diese besitzen ebenfalls komplexe Plastiden mit drei oder vier Membranen, die Plastide besitzt allerdings einen

Rotalgenursprung. 1999 postulierte Cavalier-Smith, dass die Vertreter der Chromalveolaten monophyletischen Ursprungs seien, also das Resultat eines singulären Endocytobioseereignisses zwischen einer Wirtszelle und einer Rhodophyte sind (Cavalier-Smith, 1999). Hieraus entwickelten sich demnach neben den photosynthetisch aktiven Klassen der Cryptophyta, Heterokontophyta, Haptophyta und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten auch die intrazellulär parasitär lebenden Apicomplexa (Cavalier-Smith, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Adl *et al.*, 2005). Zudem werden noch weitere aplastidäre Protisten wie z.B. die Ciliaten oder die Oomyceten zu den Chromalveolaten gezählt, die ihre Plastiden sekundär wieder verloren haben sollen (Cavalier-Smith, 2002; Tyler *et al.*, 2006). Die Chromalveolaten-Hypothese wurde lange vor allem durch die Ergebnisse phylogenetischer Analysen Symbiont-spezifischer Gene gestützt (Fast *et al.*, 2001; Harper & Keeling, 2003; Patron *et al.*, 2004). In den letzten Jahren wurden jedoch auch zunehmend Daten verschiedener Wirtsgenome in die Analysen miteinbezogen, woraus sich ein anderes Bild der Chromalveolaten evolution abzeichnet. Die Daten stützen recht robust einen gemeinsamen Ursprung von Cryptophyten und Haptophyten, stellen jedoch keinen gemeinsamen Ursprung mit den übrigen Chromalveolaten her (Hackett *et al.*, 2007). Stattdessen wird inzwischen gemutmaß, dass Cryptophyten und Haptophyten das Resultat einer initialen sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge sind. Die Plastiden der übrigen Vertreter der Chromalveolata hingegen seien erst nachfolgend durch ein oder zwei tertiäre Endocytobioseereignisse entstanden (Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008). Demnach ist nach der Aufspaltung von Haptophyten und Cryptophyten eine Haptophyte wiederum phagocytiert und zur Plastide der übrigen Chromalveolatenvertreter reduziert worden. Dies würde erklären, warum die Plastiden der Chromalveolaten monophyletischer Natur scheinen, nicht aber die Wirtsorganismen. Die Evolution der Chromalveolaten ist nach wie vor in weiten Teilen unklar und Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Debatten. Der derzeitige Kenntnisstand wurde kürzlich von Sanchez-Puerta und Delwiche zusammengefasst (Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008).

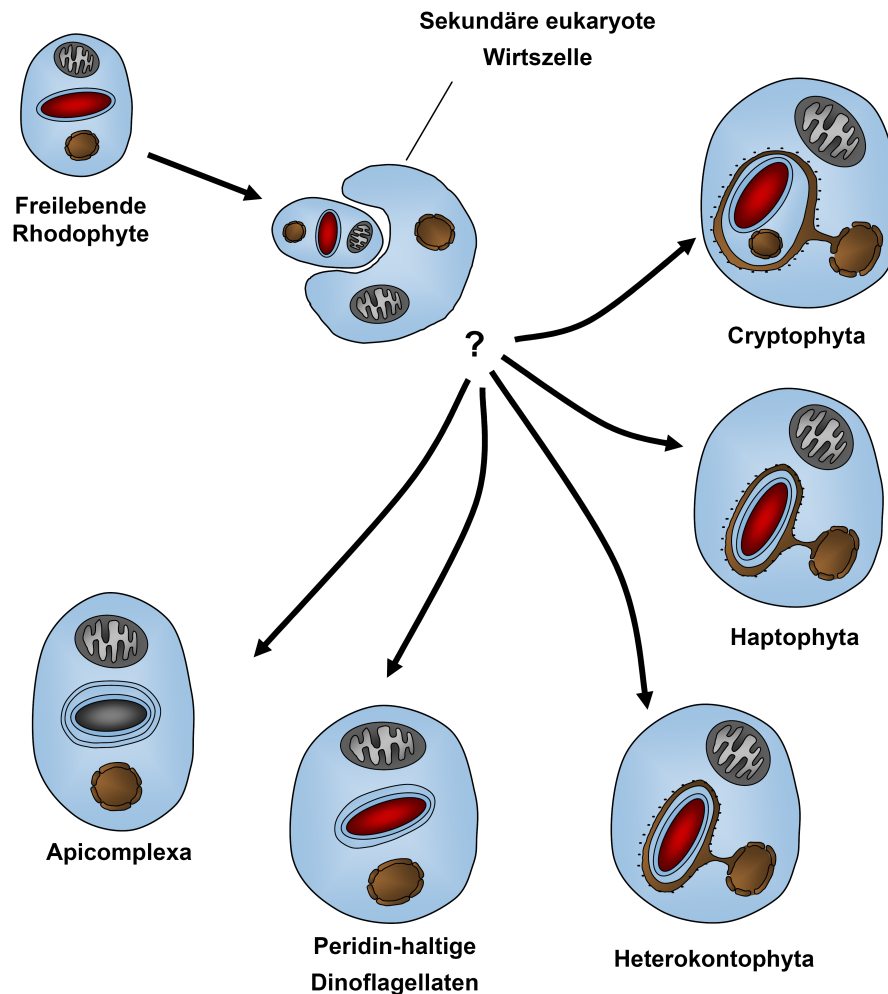


Abb. 1-2: Die Entstehung der Chromalveolaten durch sekundäre Endosymbiose

Cryptophyten, Haptophyten, Heterokontophyten, Peridin-haltige Dinoflagellaten und Apicomplexa besitzen sogenannte "komplexe" Plastiden. Diese sind das Resultat einer sekundären Endosymbiose zwischen einer eukaryoten Wirtszelle und einer phagozytierten Rotalge. Gemäß der Chromalveolaten-Hypothese von Cavalier-Smith sind die Chromalveolaten monophyletischen Ursprungs, gehen also auf ein singuläres Endocytobioseereignis zurück. Neuere genomische Daten von Chromalveolaten stellen die Validität der Chromalveolaten-Monophylie allerdings in Frage.

Wie auch bei der primären Endosymbiose ging die Evolution vom Endosymbionten zum semi-autonomen Organell mit gravierenden Reduktionsereignissen einher (Douglas *et al.*, 2001). Wieder wurden zahlreiche Endosymbiontengene eliminiert oder wurden in das Kerngenom des Wirtes transferiert. In den meisten Fällen führte die Reduktion des Endosymbionten zur völligen Eliminierung des endosymbiontischen Kerngenoms und der typischen eukaryoten Kompartimente (Maier *et al.*, 2000). Bei den Plastiden der

Euglenophyta und der peridininhaltigen Dinoflagellaten ging zudem noch eine der vier Plastidenmembranen sekundär verloren.

Ein evolutionsbiologisch interessantes Zwischenstadium weisen die nicht-verwandten Chlorarachniophyten und Cryptophyten auf. Bei Vertretern dieser Gruppen wurde zwischen zweiter und dritter Plastidenmembran noch ein Rest des ursprünglichen Cytosols des eukaryoten Endosymbionten mitsamt eines Restzellkerns, dem sogenannten Nucleomorph, erhalten (Greenwood *et al.*, 1977; Hibberd & Norris, 1984). In diesem, als periplastidäres Kompartiment (*periplastidal compartment*; PPC) bezeichneten Reaktionsraum ist ein eigener Transkriptions- und Translationsapparat lokalisiert. Die Analyse der Ribosomen des PPC identifizierte sie als 80S-Ribosomen und bestätigte damit die eukaryote Natur der Endosymbionten (McFadden *et al.*, 1994).

Chlorarachniophyta und Cryptophyta können daher, rein nominell, als *missing link* zwischen den verschiedenen evolutionären Stufen einer sekundären Endosymbiose betrachtet werden, und dienen daher als Modellorganismen bei der Erforschung von Mechanismen der Evolution von Endosymbiosen.

1.2.1 Die Architektur der komplexen Plastiden der Chromalveolaten

Mit Ausnahme der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten sind die Plastiden der Chromalveolaten von vier Membranen umgeben. Die äußerste von diesen geht vermutlich auf die ursprüngliche Membran der phagotrophen Vakuole zurück, mit der der Endosymbiont einst phagozytiert wurde (Cavalier-Smith, 2000). Bei den Heterokontophyten, Haptophyten und Cryptophyten bildet die äußerste Plastidenmembran ein Kontinuum mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) des Wirtes (Cavalier-Smith, 2003), man spricht hierbei daher auch vom chloroplastidären ER (cER). Diese Verbindung konnte bisher bei Apicomplexen nicht nachgewiesen werden, weshalb man davon ausgeht, dass die Plastide (hier Apicoplast genannt) bei diesen frei im Cytosol vorliegt. Die zweite Plastidenmembran ist höchstwahrscheinlich homolog zur Plasmamembran der vormals freilebenden Rotalge (Cavalier-Smith, 2001) und wird periplastidäre Membran (PPM) genannt. Sie trennt das cER-Lumen vom periplastidären Kompartiment (PPC), dem Restcytoplasma des Rotalgenendosymbionten (Hofmann *et al.*, 1994). Die dritte und vierte Membran entsprechen der äußeren und inneren Membran der primären Plastide der Rotalge. Zwischen ihnen liegt der sogenannte Intermembranraum (*intermembrane space*, IMS), die vierte Membran umschließt das Plastidenstroma. Abb. 1-3 gibt einen beispielhaften Überblick über die grundlegende Architektur eines Heterokontophyten mit Focus auf der komplexen Plastide.

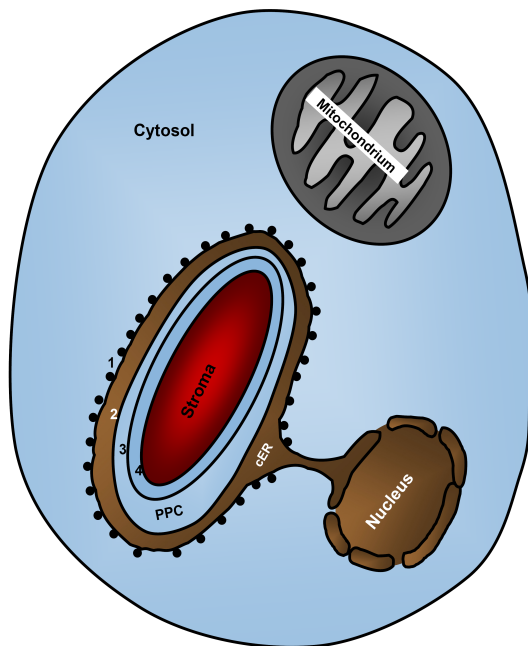


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Zellmorphologie von Heterokontophyten

Das Hauptaugenmerk liegt auf der komplexen Plastide. Die erste der vier Plastidenmembranen (1) der Heterokontophyten bildet ein Kontinuum mit dem ER des Wirtes, und ist mit 80S-Ribosomen besetzt. Man spricht deshalb auch vom chloroplastidären ER (cER). Die zweite Membran (2), die sogenannte periplastidäre Membran (PPM) ist vermutlich homolog zur Plasmamembran der vormals freilebenden Rotalge. Sie trennt das cER-Lumen vom periplastidären Kompartiment (PPC), dem Restcytoplasma des Rotalgenendosymbionten, ab. Im PPC liegt die vormals primäre Plastide der Rotalge, die Membranen drei und vier (3 u. 4) sind also homolog zur inneren und äußeren Membran primärer Rhodoplasten.

1.3 Plastidärer Proteinimport

1.3.1 Proteinimport in primäre Plastiden

Wie unter 1.1.1 erwähnt, wurde bei der Etablierung des primären, cyanobakteriellen Endosymbionten hin zum Organell eine Vielzahl Protein-codierender Gene in den Wirtszellkern transferiert. Dies verschaffte dem Wirt eine zunehmende Kontrolle über den Endosymbionten, erforderte aber zunächst die Etablierung eines effizienten Reimportmechanismus, so dass die entsprechenden Genprodukte wieder an ihren Wirkungsort, die Plastide, zurück gelangen konnten. Zweierlei war hierfür von Nöten: 1. geeignete Zielsteuerungssignale und 2. eine entsprechende Translokationsmaschinerie, die plastidäre Proteine anhand ihrer Zielsteuerungssignale spezifisch erkennen und über die beiden umgebenden Plastidenmembranen transportieren kann.

Tatsächlich findet man bei nukleär codierten plastidären Proteinen N-terminale Extensionen, die als Zielsteuerungssequenzen dienen. Diese als Transitpeptid bezeichneten Aminosäureabschnitte sind in der Regel zwischen 15 und 150 Aminosäuren lang, enthalten überproportional viele hydroxylierte Aminosäuren (Serin und Threonin) und besitzen eine positive Nettoladung (Patron & Waller, 2007). Darüber hinaus konnten keine gemeinsamen

Sequenzmotive identifiziert werden. Man geht daher davon aus, dass Transitpeptide ihre Importkompetenz nicht aufgrund ihrer Primärstruktur, sondern durch sekundäre Struktureigenschaften und/oder physikochemische Eigenschaften vermitteln (Patron & Waller, 2007).

Als die eigentlichen Translokatoren konnten in den vergangenen Jahren zwei Multiproteinkomplexe identifiziert werden, das Translokon der äußeren Chloroplastenmembran (*Translocon of the outer chloroplast membrane*; Toc) und das Translokon der inneren Chloroplastenmembran (*Translocon of the inner chloroplast membrane*; Tic; siehe Abb. 1-4).

Der Toc-Kernkomplex besteht aus drei Untereinheiten: Toc75, ein aus β -Faltblättern gebildetes, fassförmiges Porenprotein (β -barrel-Protein) der Omp85-Familie (Schnell *et al.*, 1994) (siehe 1.3.1.1), und die beiden GTPasen Toc159 und Toc34 (Kessler *et al.*, 1994). Toc34 und Toc159 fungieren als Rezeptormoleküle, die die Transitpeptide neu synthetisierter plastidärer Proteine auf bisher ungeklärte Weise erkennen und binden. Die tatsächliche Reihenfolge der Ereignisse ist hierbei zwar noch nicht endgültig geklärt, aber neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Toc34 als initialer Rezeptor dient (Becker *et al.*, 2004). Demnach bindet Toc34 Vorläuferproteine in einer GTP-gebundenen Form und dimerisiert nachfolgend mit Toc159. Hydrolyse von GTP führt anschließend zur Dissoziation des Heterodimers, wobei das Plastidenprotein an Toc159 weitergereicht wird. Die Hydrolyse von GTP durch Toc159 wiederum führt zur Insertion des Vorläuferproteins in den Proteinkanal Toc75 (sog. Motormodell der Proteintranslokation (Becker *et al.*, 2004)). Weitere Toc159-GTP-Hydrolyse führt gemäß dieses Modells zum Weitertransport des Vorläuferproteins über Toc75 in den Intermembranraum zwischen äußerer und innerer Membran. Im Intermembranraum wird die Aktivität eines Chaperons der Hsp70-Familie vermutet, das in Abhängigkeit von ATP die Translokation der Präproteine hin zum Tic-Translokon bewerkstelligt (Becker *et al.*, 2004). Viele Details der Transportmechanismen an der äußeren Membran, sind allerdings noch ungeklärt. Einen guten Überblick über den aktuellen Kenntnisstand zum Translokationsgeschehen an der äußeren Plastidenmembran bietet der Übersichtsartikel von Agne und Kessler (Agne & Kessler, 2009).

Lückenhaft ist auch das Verständnis der weiteren Proteintranslokation über die innere Chloroplastenmembran. Obwohl zahlreiche Komponenten des Tic-Translokons beschrieben wurden, sind der konkrete Aufbau und die Zusammensetzung noch weitestgehend unklar. Auch die Natur der eigentlichen Translokationspore wird nach wie vor diskutiert; Kandidatenproteine hierfür sind Tic110 und Tic20 (Chen *et al.*, 2002; Heins *et al.*, 2002).

Neure Erkenntnisse weisen darauf hin, dass auch die Translokation über die innere Chloroplastenmembran auf einem Chaperon-getriebenen Mechanismus beruht, bei dem stromale Hsp93-Chaperone, deren Aktivität durch die Interaktion mit dem Tic-Komplex reguliert wird, die Vorläuferproteine ATP-abhängig ins Stroma ziehen (Chou *et al.*, 2006).

Im Stroma der Plastide erfolgt abschließend die Abspaltung der Transitpeptide durch eine Zink-Metalloprotease der Familie M16 (Richter & Lamppa, 1998). Die fertig prozessierten stromalen Proteine werden abschließend in ihre native Konformation gefaltet, thylakoidale Proteine werden nach diesem Prozessierungsschritt weiter in die Thylakoide transportiert. Der aktuelle Kenntnisstand über den plastidären Proteinimport wurde kürzlich von Jarvis in einem ausführlichen Übersichtsartikel zusammengefasst (Jarvis, 2008).

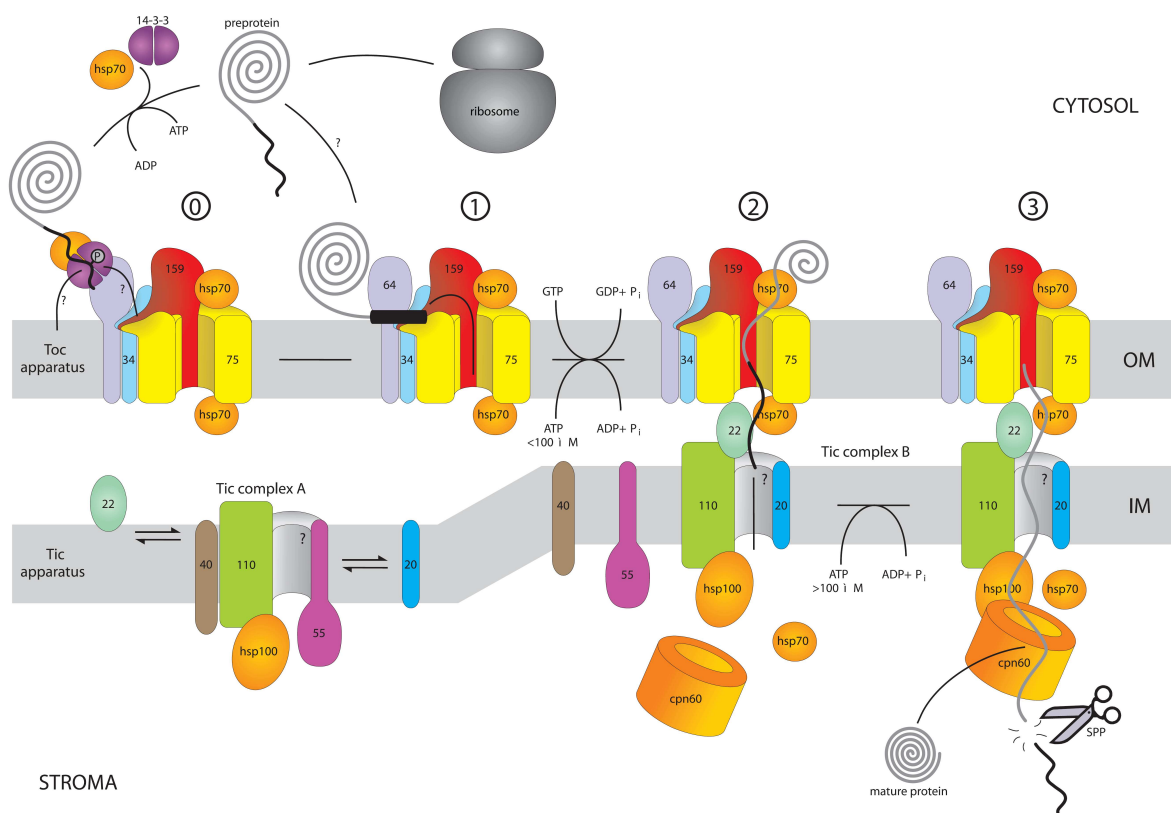


Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Proteinimports in primäre Plastiden

Plastidäre Proteine werden im Cytosol synthetisiert und werden posttranslational in die Plastide importiert. Hierfür wirkt das N-terminale Transitpeptid als Zielsteuerungssequenz, dass die Erkennung und Bindung durch Rezeptoren des Toc-Translokons vermittelt. Präproteine werden durch das Porenprotein Toc75 in den Intermembranraum transportiert und von dort über das Tic-Translokon weiter in das Stroma. Die Translokationsenergie wird vermutlich von Chaperonen im IMS und im Stroma durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Aus Jarvis & Soll, 2001.

1.3.1.1 Toc75 gehört zur Familie der Omp85-Proteine

Eine zentrale Bedeutung beim Proteintransport über die äußere Plastidenmembran kommt Toc75 zu, das hier die eigentliche Proteinpore in der Membran bildet. Eingehende Sequenzanalysen offenbarten 1999, dass Toc75 kein originär eukaryotes Protein ist, sondern höchstwahrscheinlich von bakteriellen Proteinen der Omp85-Familie abstammt (Bölter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999). Proteine der Omp85-Familie (*Outer membrane protein of 85 kDa*) sind essentielle Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (Thomas *et al.*, 2001). Sie scheinen hier ubiquitär vorhanden zu sein, da man sie bisher in den Genomen aller sequenzierter Bakterien mit innerer und äußerer Membran identifizieren konnte, und gelten daher als eine der ältesten bekannten Proteinfamilien überhaupt (Voulhoux & Tommassen, 2004). Omp85-Proteine besitzen eine grundlegend konservierte Tertiärstruktur mit einer sogenannten β -barrel-Domäne im C-terminalen Bereich und einer Polypeptidtransport-assoziierten Domäne (POTRA-Domäne) im N-terminalen Bereich (Gentle *et al.*, 2005).

Die β -barrel-Domäne besteht aus 16 antiparallel angeordneten β -Faltblättern, die eine dreidimensionale Fassstruktur bilden, über die das Protein in die äußere Bakterienmembran integriert ist. Die POTRA-Domäne ist das eigentliche, definierende Merkmal von Omp85-Proteinen. Sie wird gebildet von einer unterschiedlichen Zahl (in der Regel 1 – 5) von kurzen POTRA-Motiven, die in den periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Membran ragen (Gentle *et al.*, 2005). Allerdings sind weder die β -barrel-Domänen noch die POTRA-Motive stark in ihrer Aminosäuresequenz konserviert, sondern vielmehr in ihrer räumlichen Struktur (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). So sind im Fall der POTRA-Motive nur sehr wenige kritische Aminosäuren konserviert, die Struktur aber, eine spezifische Abfolge von Sekundärstrukturmotiven aus einem β -Faltblatt, zwei α -Helices und zwei weiteren β -Faltblättern (β_1 , α_1 , α_2 , β_2 , β_3) ist charakteristisch (Kim *et al.*, 2007).

Der essentielle Charakter der Omp85-Proteine rührt von ihrer Funktion bei der Integration von Membranproteinen der äußeren Bakterienmembran her. Anders als Membranproteine der inneren Bakterienmembran oder eukaryoter Membranen, die durch transmembran- α -Helices integriert werden, sind alle Proteine der äußeren Bakterienmembran, so wie Omp85 über β -barrel-Domänen in der Membran verankert (Koebnik *et al.*, 2000). Inzwischen ist bekannt, dass Omp85 als zentrale Integrase in einem Komplex mit weiteren Proteinen der äußeren Membran und periplasmatischen Chaperonen agiert (die sogenannte β -barrel Assemblierungsmaschinerie BAM) (Knowles *et al.*, 2009). Eine konditionale Omp85-Deletionsmutation z.B. in *Neisseria meningitidis* führt daher zum raschen Absterben der

Zellen, wobei kurz nach Induktion des Deletionsphänotyps eine starke Akkumulation von Proteinen der äußeren Membran im Periplasma zu beobachten ist (Voulhoux *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus der Membraninsertion ist allerdings noch unklar. Die Pore des Omp85 β -barrel scheint hier eine Rolle zu spielen, da ein chimäres Protein, in dem die Omp85- β -barrel-Domäne gegen die β -barrel-Domäne der *outer membrane phospholipase A* ausgetauscht wurde, den letalen Phänotyp einer Omp85-Deletion in *N. meningitidis* nicht komplementieren kann (Bos *et al.*, 2007). Andererseits widersprechen elektrophysiologisch ermittelte Porendurchmesser einer direkten Insertion von Membranproteinen durch den β -barrel, da dieser für die Passage von Polypeptidketten eigentlich zu klein ist (Bredemeier *et al.*, 2007).

Auch ist nicht genau verstanden, welche Funktion die POTRA-Domänen besitzen. Diskutiert werden unter anderem eine Funktion bei der Erkennung von Substraten, als „Interaktionsplattform“ für weitere Komponenten des BAM-Komplexes und/oder eine Chaperon-artige Funktion, die die Faltung und Integration der Membranproteine unterstützt (Bos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Knowles *et al.*, 2008).

Außer in den äußeren Membranen von gram-negativen Bakterien findet man Omp85-Homologe auch in den äußeren Membranen von eukaryoten Organellen, die aus bakteriellen Endosymbionten hervorgegangen sind, also den Mitochondrien und Plastiden. So konnte gezeigt werden, dass auch in der äußeren Membran von Mitochondrien ein Omp85-Homolog, das *sorting and assembling machinery protein of 50 kDa* (Sam50), essentiell für die Integration von β -barrel-Proteinen in die äußere Mitochondrienmembran ist (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003).

Erst einige Jahre nach der erstmaligen Identifizierung der zentralen Proteinimportpore der äußeren Chloroplastenmembran, Toc75, stellte sich heraus, dass auch dieses Protein zur Familie der Omp85-Proteine gehört, und anscheinend aus einem cyanobakteriellen Vorläuferprotein evolvierte (Bölter *et al.*, 1998; Reumann *et al.*, 1999). Offensichtlich aber hatte sich hier die Funktion des Proteins im Laufe der Plastidenevolution gewandelt, so dass es nun nicht mehr als Integrase für Membranproteine dient, sondern als der eigentliche Protein-translozierende Kanal der äußeren Plastidenmembran.

Elektrophysiologische Analysen an verschiedenen Omp85-Proteinen zeigten, dass deren β -barrel-Domänen in der Lage sind, Ionen-permeable Poren in Membranen zu bilden (Hinnah *et al.*, 2002; Bredemeier *et al.*, 2007). Alle diese Omp85-Poren sind Kationen-selektiv und haben ein vergleichbares Umkehrpotential. Allerdings unterscheiden sich proteobakterielle und cyanobakterielle Omp85-Proteine deutlich hinsichtlich ihrer Leitwerte. Diese sind bei den

cyanobakteriellen Vertretern deutlich erhöht, was mit einem ungefähr fünfmal größeren Durchmesser der β -barrel-Pore korreliert. Diese elektrophysiologischen Unterschiede zeigen sich nicht nur in den Omp85-Proteinen der beiden Bakteriengruppen, sondern sind auch in den jeweils von diesen abgeleiteten Organellen erhalten geblieben. Das heißt, mitochondrielle Sam50-Proteine weisen ähnliche Eigenschaften wie proteobakterielle Omp85-Proteine auf, wohingegen die Charakteristika plastidärer Toc75-Proteine denen der cyanobakteriellen Omp85-Proteine entsprechen (Ertel *et al.*, 2005; Bredemeier *et al.*, 2007). Rein nominell lassen sich Omp85-Proteine daher in zwei Subtypen unterteilen, Sam50-artige (proteobakterielle und mitochondrielle) und Toc75-artige (cyanobakterielle und plastidäre). Bredemeier und Kollegen schlussfolgern, dass die unterschiedlichen Poreneigenschaften ausschlaggebend für die weitere Entwicklung des cyanobakteriellen Omp85-Proteins hin zum Proteintranslokator der äußeren Plastidenmembran war. Denn nur durch den vergrößerten Porendurchmesser ist die Passage ungefalteter Polypeptide überhaupt erst möglich, das cyanobakterielle Omp85-Protein war also in dieser Hinsicht bereits für die Funktion als Proteintranslokator präadaptiert (Bredemeier *et al.*, 2007).

1.3.2 Proteinimport in komplexe Plastiden der Chromalveolaten

Wie oben erwähnt, wirkten bei der Integration von sekundären, eukaryoten Endosymbionten ähnliche Mechanismen wie bei primären Plastiden, das heißt, zahlreiche Gene wurden eliminiert oder wurden in den Wirtszellkern transferiert. Wie auch bei den primären Plastiden der Archaeplastida machte dies die Evolution effizienter Proteinreimportmechanismen, d.h. geeigneter Zielsteuerungssignale und Translokatoren, erforderlich. Jedoch ist die Situation hier durch die zusätzlichen Membranen und subplastidären Kompartimente ungleich komplexer.

Inzwischen ist bekannt, dass der Reimport von einer zweigeteilten Zielsteuerungssequenz am N-Terminus der nukleär codierten plastidären Proteine vermittelt wird. Diese zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (*bipartite targeting sequence*, BTS) besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einem Transitpeptid, das den Transitpeptiden der Archaeplastida ähnelt. Das Signalpeptid der BTS vermittelt hierbei zunächst einen co-translationalen Import über das Sec61-Translokon in das Lumen des ER, so wie man es von sekretorischen Proteinen kennt (Bhaya & Grossman, 1991; Ishida *et al.*, 2000; Wastl & Maier, 2000). Im ER-Lumen erfolgt anschließend die Abspaltung des Signalpeptids, so dass nun das Transitpeptid am N-Terminus vorliegt (Wastl & Maier, 2000). Bei Heterokontophyten, Haptophyten und

Cryptophyten befinden sich die Proteine nun im chloroplastidären ER und treffen dort direkt auf die periplastidäre Membran. Bei den Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und den Apicomplexen, bei denen keine direkte Verbindung zwischen ER und Plastide besteht, erfolgt der Weitertransport der plastidären Proteine zum Organell vesikulär (Nassoury *et al.*, 2003; Tonkin *et al.*, 2006).

Für den Proteintransport über die zweite Membran wurde erst kürzlich ein plausibles Modell entwickelt. Bei der Analyse des Nucleomorphgenoms der Cryptophyte *Guillardia theta* (Douglas *et al.*, 2001) fanden Sommer und Kollegen, dass mehrere Gene für Untereinheiten der ER-assoziierten Degradationsmaschinerie (ERAD) des Endosymbionten im Nucleomorphgenom erhalten geblieben waren (Sommer *et al.*, 2007). Derartige symbiont-spezifische Kopien von ERAD-Faktoren fanden sich darüber hinaus auch in den Kerngenomen weiterer Chromalveolaten, wie z.B. den Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* und dem Apicomplexen *Plasmodium falciparum*. Entsprechende Kopien besitzen eine vorhergesagte BTS am N-Terminus, und konnten sowohl in *P. tricornutum* als auch in *P. falciparum* erfolgreich in der komplexen Plastide bzw. dem Apicoplasten lokalisiert werden. Die ERAD-Maschinerie dient in Eukaryoten normalerweise der Erkennung missgefalteter Proteine im ER und deren Reexport über die ER-Membran ins Cytoplasma, wo diese proteasomal degradiert werden. Da im Restcytoplasma des Endosymbionten jedoch kein ER mehr erhalten ist, drängte sich die Frage nach der Funktion der symbiontischen ERAD-Faktoren auf. Da ERAD ein System darstellt, das in der Lage ist, ungefaltete Proteine aus dem ER-Lumen ins Cytoplasma zu transportieren, postulierten Sommer *et al.*, dass die ERAD-Maschinerie des Endosymbionten vom ER in die periplastidäre Membran relokalisiert wurde, und dort nun als Translokator plastidärer Präproteine dient (Sommer *et al.*, 2007). Neure Befunde aus Studien an *P. tricornutum* und dem Apicomplexen *Toxoplasma gondii* stützen diese Hypothese (Agrawal *et al.*, 2009; Hempel *et al.*, 2009), die symbiontische ERAD-Maschinerie wurde daher zur besseren Unterscheidung vom Wirts-ERAD in SELMA umbenannt (*symbiotic ERAD-like machinery*) (Hempel *et al.*, 2009). Unklar ist allerdings weiterhin, wie plastidäre Präproteine im Lumen zwischen erster und zweiter Membran bzw. an der PPM erkannt werden. Da das Signalpeptid nach dem Import über die äußerste Membran abgespalten wird, wird angenommen, dass das Transitpeptid diese Transportkompetenz vermittelt. Der genaue Mechanismus oder entsprechende Rezeptormoleküle sind allerdings bisher unbekannt.

Nach dem Transport über die PPM erreichen die Vorläuferproteine das periplastidäre Kompartiment. Hier erfolgt ein Diskriminierungsschritt, der PPC-residente Proteine von

stromalen Proteinen unterscheidet, die noch weiter über die beiden verbleibenden Membranen transportiert werden müssen. Es konnte gezeigt werden, dass das entscheidende Zielsteuerungssignal hierfür die erste Aminosäure („+1-Position“) des Transitpeptids ist. Wenn diese Position von einer raumgreifenden, hydrophoben Aminosäure besetzt ist, erfolgt ein Weitertransport über die beiden innersten Membranen (Gould *et al.*, 2006; Gruber *et al.*, 2007). In der Regel ist dies die aromatische Aminosäure Phenylalanin, aber auch die aromatischen Aminosäuren Thyrosin und Tryptophan sowie Leucin vermitteln den stromalen Import. Ist keine dieser Aminosäuren am N-Terminus vorhanden, verbleiben die entsprechenden Proteine im PPC (Gould *et al.*, 2006). Der eigentliche Mechanismus aber, mit dem die unterschiedlichen Proteinspezies erkannt und sortiert werden, ist bisher unbekannt. Möglich wäre z.B. eine Unterscheidung bereits beim Transport über die PPM durch SELMA, da gezeigt werden konnte, dass SELMA-Untereinheiten spezifisch mit den Transitpeptiden PPC-residenter Proteine interagieren, nicht aber mit denen stromaler Proteine (Hempel *et al.*, 2009). Alternativ wäre eine Diskriminierung durch eine selektive Prozessierung möglich, denn ähnlich wie im Stroma primärer Plastiden erfolgt auch im PPC die Prozessierung der Transitpeptide, wie anhand der PPC-lokalisierten Granula-gebundenen Stärkesynthase 1 (*granule-bound starch synthase 1*, GBSS1) der Cryptophyte *G. theta* gezeigt werden konnte (Deschamps *et al.*, 2006). Zwar ist bisher nichts über die Natur einer entsprechenden Peptidase im PPC bekannt, hypothetisch aber böte sie eine elegante Diskriminierungsoption, indem ausschließlich Transitpeptide ohne aromatische Aminosäure an der +1-Position prozessiert würden, nicht aber Transitpeptide mit einer aromatischen Aminosäure bzw. Leucin an der +1-Position.

Das Transitpeptid stromal lokalisierter Proteine wird nach dem Import über alle vier Membranen genau wie bei stromalen Proteinen primärer Plastiden abgespalten. Hierfür konnte in den Genomen diverser Chromalveolaten ein stark konserviertes Homolog zur stromalen prozessierenden Peptidase aus Pflanzen identifiziert werden, dass allerdings bisher nicht funktionell untersucht wurde (Bullmann, unveröffentlicht).

Die beiden innersten Plastidenmembranen sind, wie oben erwähnt, homolog zur äußeren und inneren Membran primärer Plastiden. Man könnte daher erwarten, dass die Proteintranslokation hier durch von Toc und Tic abgeleitete Translokatoren bewerkstelligt wird. Tatsächlich finden sich in den Genomen verschiedener Chromalveolaten Homologe zu Untereinheiten des pflanzlichen Tic-Komplexes, u.a. auch Homologe der als Translokationspore diskutierten Proteine Tic110 und Tic20 (Douglas *et al.*, 2001; McFadden & van Dooren, 2004). Zumindest im Apicomplexen *T. gondii* konnte bereits eine Lokalisation

des Tic20-Homologs in der innersten Plastidenmembran und eine Funktion dieses Proteins beim plastidären Proteinimport gezeigt werden (van Dooren *et al.*, 2008).

Im Gegensatz dazu konnten lange Zeit keine Homologen zu Komponenten des Toc-Komplexes identifiziert werden, wofür zwei unterschiedliche Erklärungen formuliert wurden: entweder, entsprechende Homologe sind derart stark von den pflanzlichen Proteinen divergiert, so dass sie sich mit gängigen Sequenzvergleichsverfahren nicht identifizieren lassen, oder der Toc-Komplex ging in den komplexen Plastiden der Chromalveolaten verloren, und wurde durch eine alternative Maschinerie ersetzt (Tonkin *et al.*, 2007).

Abb. 1-5 fasst den derzeitigen Kenntnisstand zum Proteinimport in komplexe Plastiden am Beispiel einer Heterokontophyte schematisch zusammen.

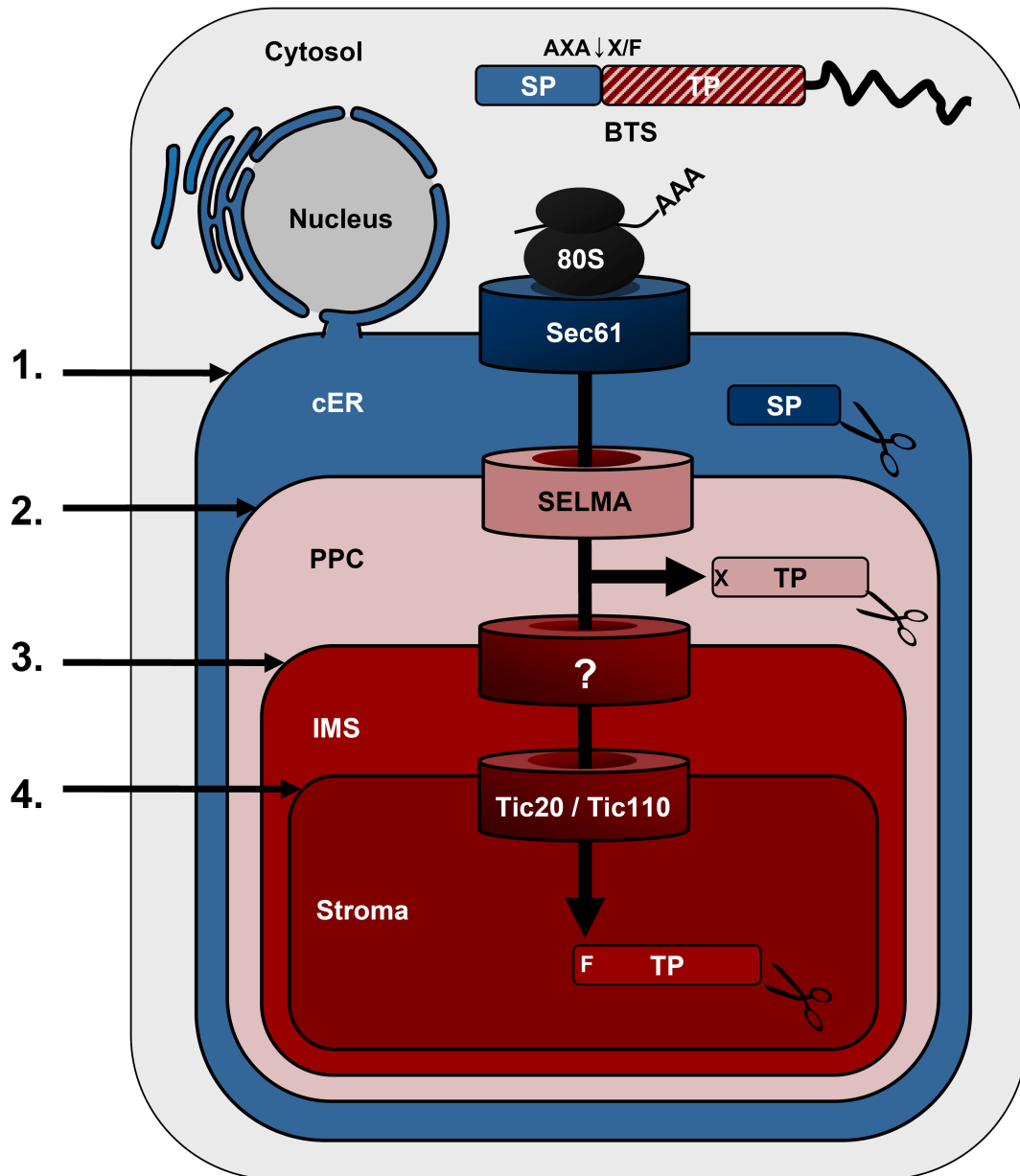


Abb. 1-5: Proteinimport in komplexe Plastiden der Heterokontophyten

Nukleär codierte plastidäre Proteine besitzen am N-Terminus eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (*bipartite targeting sequence*, BTS), bestehend aus einem N-terminalen Signalpeptid (SP), gefolgt von einem Transitpeptid (TP). Das Signalpeptid der BTS vermittelt hierbei zunächst einen co-translationalen Import über das Sec61-Translokion in das cER-Lumen. Nach Abspaltung des Signalpeptids vermittelt das Transitpeptid den Weitertransport über die PPM, vermutlich durch den vom endosymbiontischen ERAD-System abgeleiteten SELMA-Komplex. Im PPC erfolgt eine Trennung verschieden lokalisierter Proteine. Stromale Proteine besitzen an der ersten Position des Transitpeptides eine aromatische Aminosäure oder Leucin, die als Zielsteuerungssignal für einen Weitertransport über die beiden innersten Membranen fungiert. Proteine ohne eine dieser Aminosäuren verbleiben hingegen im PPC. Der Transport über die innerste Membran wird vermutlich, ähnlich wie bei primären Plastiden, von einem Tic-Komplex vermittelt. Der Translokator der dritten Membran ist dagegen bisher unbekannt.

1.3.2.1 Ein putatives Omp85-Homolog in *Phaeodactylum tricornutum*?

Die pennate Diatomee („Kieselalge“) *Phaeodactylum tricornutum* gehört als Vertreter der Bacillariophyceae zur Gruppe der Heterokontophyta. Aufgrund zahlreicher Vorteile hat sie sich in den vergangenen Jahren zunehmend als Modellorganismus der Biotechnologie sowie der molekularen und physiologischen Zell- und Evolutionsbiologie etabliert.

So ist *P. tricornutum* einfach axenisch zu kultivieren und weist unter optimalen Kulturbedingungen hohe Wachstumsraten auf. Außerdem stehen für die Diatomee effektive Transfektionstechniken zur Verfügung, was die genetische Manipulation ermöglicht (Kroth, 2007). Schließlich ist seit 2008 die vollständige Genomsequenz der Alge veröffentlicht (Bowler *et al.*, 2008), und als Internetdatenbank frei zugänglich (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>).

Auch auf dem Forschungsgebiet des plastidären Proteinimports ist *P. tricornutum* in den letzten Jahren verstärkt in den Focus der Wissenschaft gerückt. So wurden z.B. wesentliche Erkenntnisse über den Proteintransport über die zweite Plastidenmembran der Chromalveolaten in dieser Modellalge geklärt (Sommer *et al.*, 2007; Hempel *et al.*, 2009).

2007 berichteten Wunder und Kollegen schließlich von der Identifikation eines im Genom von *P. tricornutum* codierten Proteins, das Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen der Omp85-Familie aufweist (Wunder *et al.*, 2007) zu der auch die eigentliche Proteintranslokationspore des Toc-Komplexes, Toc75 gehört. Damit stellt dieses Protein erstmals einen Kandidaten für das Translokon der dritten Plastidenmembran in Chromalveolaten dar, der experimentell untersucht werden kann.

2 Zielsetzung

Die Etablierung einer Rotalge vom Endosymbionten zum semi-autonomen Organell, der komplexen Plastide, stellte die ancestrale Chromalveolatenwirtszelle vor enorme Herausforderungen. Neben dem Austausch von Metaboliten durch neue Stofftransportmechanismen, und damit einer physiologischen Integration, war insbesondere die Kontrolle des Wirtes über den Endosymbionten unerlässlich. Hierfür zeichnete vor allem eine verstärkte genetische Integration verantwortlich, das heißt, eine Vielzahl der Gene des Endosymbionten wurde in das Kerngenom des Wirtes transferiert. Zwingende Voraussetzung für diese genetische Integration war daher die Etablierung effektiver Reimportmechanismen, die die Produkte der transferierten Gene wieder an den Ort ihrer Bestimmung in der Plastide transportieren.

Viele Aspekte dieses Reimports konnten in den vergangenen Jahren geklärt werden, etliche Details aber sind nach wie vor unverstanden. Einen zentralen Punkt stellt hierbei der Transport von stromalen Proteinen über die drittäußerste Membran der komplexen Plastide dar. Obwohl diese Membran homolog zur äußeren Membran primärer Plastiden ist, konnte lange Zeit in keinem der bekannten Chromalveolatengenome ein Homolog der zentralen Komponente des chloroplastidären Toc-Translokons, Toc75, identifiziert werden. Erst Ende 2007 berichteten Wunder und Kollegen erstmals von einem putativen Omp85-Homolog im Genom von *Phaeodactylum tricornutum* (Wunder et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, das identifizierte Protein eingehender zu analysieren und ggf. eine Beteiligung des Proteins beim plastidären Proteinimport der Alge zu klären.

Hierfür soll zunächst grundlegend ermittelt werden, ob das Protein innerhalb der Omp85-Familie zur Subfamilie der Sam50-artigen oder der Toc75-artigen Proteine gehört.

Neben eingehenderen *in silico*-Analysen sollten dafür vor allem verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Verfahren zum Einsatz kommen.

Durch den Einsatz von verschiedenen GFP-Derivaten sollte in *in vivo*-Lokalisationsexperimenten die subzelluläre Lokalisation von ptOmp85 möglichst genau aufgeklärt werden.

Zudem sollte das Protein heterolog überexprimiert, aufgereinigt und in artifizielle Biomembranen integriert werden. Durch elektrophysiologische Messungen sollte das Protein mit anderen Omp85-Proteinen auf Basis bekannter Daten verglichen werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in Analysequalität (*pro analysis*) bezogen. Die Verwendung und Lagerung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2 Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Enzyme von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und gemäß Herstellerangaben gelagert und verwendet.

3.3 Molekularbiologische Kits

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences
JETsorb DNA Extraction Kit	GENOMED
Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas
SuperScript II First-Strand Synthesis Kit	Invitrogen
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Finnzymes

3.4 Filter und Membranen

Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel
Whatman - Filterpapier (3mm)	Schleicher & Schuell
FP30/ 0,2 CA - S Filtereinheit zur Sterilfiltration	Schleicher & Schuell

3.5 Photobedarf

Medical X-Ray Film (100 NIF, 30 x 40cm)	Fuji
Röntgenfilm - Entwickler	Kodak
Röntgenfilm - Fixierer	Kodak

3.6 Antikörper

Goat-anti-GFP
Rabbit-anti-Hexa-Histidin
Rabbit-anti-Goat-IgG (HRP-gekoppelt)
Mouse-anti-Rabbit-IgG (HRP-gekoppelt)

3.7 Geräte

3.7.1 Zentrifugen

Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Mini Spin Plus Tischzentrifuge	Eppendorf
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter

3.7.2 Zubehör für Agarose-Gelelektrophorese

Geldokumentationssystem Gel Doc 1000	Bio-RAD
GPS 200/ 400 Power Supply	Pharmacia LKB
UV - Schirm Spectroline® Longlife™ Filter	Spectronics Corporation

3.7.3 Zubehör für SDS – Poly-Acrylamidgelelektrophorese

Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply – EPS 301	Amersham Biosciences
Mighty Small dual gel caster	Hoefer Scientific
TE 77 semi - dry transfer unit	Amersham Biosciences

3.7.4 Weitere Geräte

KLSM Leica TCS SP2	Leica Microsystems
Mastercycler Gradient/ Personal	Eppendorf
Schüttler Certomat [®] R	B. Braun Biotech
Sequenzierer ABI 377	Applied Biosciences
TRM -V Taumelschüttler	MAGV
FRENCH Pressure Cell Press	AMICO
Photospektrometer ND-1000	NanoDrop
Klimaschrank MLR-350	SANYO
Schüttler Certomat R	Braun Biotech International
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad

3.8 Organismen

<i>Escherichia coli</i> BL21 - CodonPlus [®] (DER)-RIL	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> Top10	Stratagene
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Stamm CCAP1055/1	

3.9 Vektoren

pJet1.2:

ampR; rep(pMB1); *eco47IR*

pPha-NR:

ampR; NR_{Promotor} – MCS – NR_{Terminator}; FcpA_{Promotor} – *sh ble* – FcpA_{Terminator}; f1 ori

pPha-Dual_{L/NR}

ampR; FcpB_{Promotor} – MCS1 – FcpB_{Terminator}; NR_{Promotor} – MCS2 – NR_{Terminator}; FcpA_{Promotor} – *sh ble* – FcpA_{Terminator}; f1 ori

pPha-Dual_{2xNR}

ampR; NR_{Promotor} – MCS1 – NR_{Terminator}; NR_{Promotor} – MCS2 – NR_{Terminator}; FcpA_{Promotor} – *sh ble* – FcpA_{Terminator}; f1 ori

pQE30

ampR; Lactose_{Promotor} Hexa-Histidin-MCS; ColE1

3.10 Gelelektrophorese-Längenstandards

3.10.1 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandard wurde der Marker *GeneRuler™ Express DNA Ladder* (Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet.

3.10.2 Proteinmolekulargewichtsstandards

Als Proteinmolekulargewichtsstandard wurde der Marker *PageRuler™ prestained protein Ladder* (MBI-Fermentas), mit einem Auftrennungsbereich von 10-170 kDa, nach Herstellerangaben verwendet.

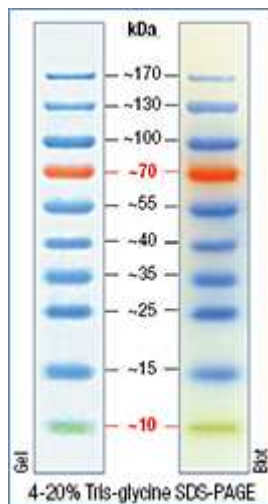


Abb. 3-1: Bandenmuster des *PageRuler™ prestained protein Ladder*-Proteinmolekulargewichtsstandard (Quelle: www.fermentas.de)

3.11 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG Biotech AG in HPSF-Qualität bezogen. Eine detaillierte Auflistung sämtlicher verwendeter Primer findet sich im Anhang.

4 Methoden

4.1 *In silico*-Analysen

4.1.1 Genom-, Nukleinsäure- und Proteindatenbanken

Die in dieser Arbeit aufgeführten Gen- und Proteinsequenzen wurden von folgenden Datenbanken bezogen:

Phaeodactylum tricornutum Genomdatenbank

<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>

Thalassiosira pseudonana Genomdatenbank

<http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html>

Emiliania huxleyi Genomdatenbank

<http://genome.jgi-psf.org/Emihu1/Emihu1.home.html>

Plasmodium falciparum Genomdatenbank

<http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>

Toxoplasma gondii Genomdatenbank

<http://toxodb.org/toxo/>

Cyanidioschyzon merolae Genomdatenbank

<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>

NCBI Genbank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Expasy Proteindatenbank

<http://ca.expasy.org/sprot/>

4.1.2 Proteinsequenzanalyseprogramme

Für die *in silico*-Analyse von Proteinen wurde auf folgende Internetressourcen zurückgegriffen:

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Vorhersage von Zielsteuerungssequenzen (SignalP, Target P) (Emanuelsson *et al.*, 2000; Dyrlov Bendtsen *et al.*, 2004)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

Vorhersage von apicoplastidären Zielsteuerungssequenzen (PATS) (Zuegge *et al.*, 2001)

<http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/pats/pats-index.php>

Vorhersage von Transmembrandomänen (TMHMM)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

Kyte-Doolittle-Hydropathieplots (Kyte & Doolittle, 1982)

<http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm>

β -barrel-Vorhersagen (Bagos *et al.*, 2004; Gromiha & Suwa, 2005; Waldispühl *et al.*, 2006)

<http://bioinformatics.bc.edu/clotelab/transFold/>

<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp>

<http://psfs.cbrc.jp/tmbeta-net/>

4.1.3 Dreidimensionale Proteinmodellierung

Zur Identifikation der POTRA-Domäne in ptOmp85 wurden multiple Alignments mit bekannten Omp85-Proteinen erstellt.

Für die Erstellung eines dreidimensionalen *in silico*-Modells wurden zunächst Überlagerungen von bekannten Omp85-Strukturen mit ptOmp85 mit dem Programm MUSTANG (www.yasara.org) generiert. Als Matrize für die POTRA-Domäne diente hierbei die Kristallstruktur der POTRA-Domäne des cyanobakteriellen Omp85-Homologs alr2269 aus *Anabaena* sp. PCC 7120 (unveröffentlicht). Als Matrize für die β -barrel-Domäne wurde die β -barrel-Domäne von FhaC verwendet (Clantin *et al.*, 2007).

Ein initiales Modell wurde mit dem Programm Modeller v8.2 erstellt. Dieses wurde manuell mit den Programmen Nova und Yamber3 überarbeitet.

Die Modellierung von ptOmp85 wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Schleiff (Göthe-Universität Frankfurt) von Dr. Oliver Mirus durchgeführt.

4.1.4 Phylogenetische Analyse

Aminosäuresequenzen von Omp85-Proteinen wurden mittels Protein-Blast mit ptOmp85 als Matrize identifiziert bzw. aus GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) entnommen. Die Sequenzen wurden mit dem Programm MAFFT v6.708 aligned (Kato *et al.*, 2005). Die phylogenetische Analyse erfolgte nach der *maximum likelihood*-Methode mithilfe des Programms IQPNNI v3.3.1. (Minh *et al.*, 2005).

Die phylogenetischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Schleiff (Göthe-Universität Frankfurt) von Dr. Oliver Mirus durchgeführt.

4.2 Stamm- und Kulturhaltung

4.2.1 Stamm- und Kulturhaltung von *Escherichia coli*

Für diese Arbeit wurden die *E. coli*-Stämme Top10 (Invitrogen) und BL21-CodonPlus®(DER) – RIL (Stratagene) verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37°C auf einem Orbitalschüttler bei 200 rpm in sterilem LB-Medium, dem ggf. entsprechende Antibiotika zugesetzt wurden. Kurzfristige Stammhaltung erfolgte auf LB-Agar-Platten mit 1,5% (w/v) Agar-Agar. Für die langfristige Lagerung wurden 500 µl Zellkultur in LB-Medium mit 50 % (v/v) Glycerin in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

LB - Medium:

Bacto - Trypton	1 % (w/v)
Natriumchlorid	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Agar-Agar (für LB-Agarplatten)	1,5 % (w/v)
LB - Amp 50	50 µg/ ml Ampicillin
LB - Amp 100	100 µg/ ml Ampicillin

4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen des Stamms Top10 wurden nach der RbCl₂-Methode hergestellt. Hierfür wurden Top10-Zellen in 100 ml LB-Flüssigmedium mit je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ = 0,6 erreicht war. Dann wurden die Zellen für 30' auf Eis gekühlt und anschließend pelletiert (10', 4°C, 3000 x g). Das Pellet wurde in

33ml RF1 resuspendiert und die Zellen erneut wie oben auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendieren in 5 ml RF2 erfolgte eine letztmalige 30 minütige Inkubation auf Eis. Aliquots zu je 100 µl wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

RF1:

RbCl ₂	100mM
MnCl ₂	50mM
KAc (pH 7,5)	30mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (w/v)

pH auf 5,8 mit 0,2 M Essigsäure.
Steril filtrieren.

RF2:

MOPS (pH 6,8)	10mM
RbCl ₂	10mM
CaCl ₂	75mM
Glycerin	15%

pH auf 5,8 mit NaOH.
Steril filtrieren.

4.2.3 Stamm- und Kulturhaltung von *Phaeodactylum tricornutum*

Die Kultivierung von *P. tricornutum* erfolgte alternativ auf sterilen f/2-Agarplatten bzw. schüttelnd (80-100 rpm) in sterilem f/2-Flüssigmedium bei 22 °C im Dauerlicht.

f/2 - Medium

Tris/HCl (pH 8,0)	2 mM
NaNO ₃	890 µM oder
NH ₄ Cl ₂	1,5mM
NaH ₂ PO ₄	36 µM
<i>tropic marin</i> [®] Meersalz	1,66 % (w/v)

Zu dem autoklavierten f/2 - Medium wurde vor Gebrauch f/2 - Spurenelementlösung sowie f/2 - Vitaminlösung (je 1:1000) zugegeben.

f/2 - Spurenelementlösung:

FeCl ₃	11,65 mM
Na ₂ EDTA	11,71 mM
CuSO ₄	39 µM
ZnSO ₄	77 µM
CoCl ₂	42 µM
MnCl ₂	910 µM
Na ₂ MoO ₄	26 µM

f/2 - Vitaminlösung:

Biotin	2 µM
Cyanocobalmin	0,37 µM
Thiamin– HCl	297 µM

4.3 Nukleinsäureanalytik

4.3.1 Isolierung von gesamt-DNA aus *P. tricornutum*

Gesamt-DNA aus *P. tricornutum* wurde mit der CTAB-Methode nach Doyle und Doyle isoliert (Doyle & Doyle, 1990). Hierfür wurde 150 ml einer 7 Tage alten Kultur bei 1500 x g und Raumtemperatur für 10 min. zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in frischem f/2-Medium resuspendiert und gewaschen. Nach Zugabe von 2% (w/v) CTAB in Puffer B erfolgte durch einstündige Inkubation bei 70°C die Zelllyse. Durch anschließendes Zentrifugieren der Ansätze für 10 min. bei 20000 x g und Raumtemperatur wurden Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und im Lysat enthaltene Proteine mit 1 Vol. PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25/24/1) ausgefällt. Nach Phasentrennung durch 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 20000 x g wurde die obere wässrige Phase abgenommen, und zur Entfernung von Phenolresten einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation konnte aus der wässrigen Phase in einem frischen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 2/3 Volumen Isopropanol die Gesamt-DNA gefällt werden. Die DNA wurde mittels 20-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C pelletiert, das Isopropanol entfernt, und das Pellet in 800 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 20 µl H₂O_{bid.} gelöst.

Puffer B:

Tris/ HCl (pH 8,0)	100 mM
NaCl	1,4 M
Na ₂ EDTA	20 mM
β - Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)

4.3.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979). Hierfür wurden Zellen aus 1,5 ml einer ü.N.-Kultur durch Zentrifugation (1', 13000 x g, Raumtemperatur) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 wurden die Zellen während 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert, und Proteine und DNA denaturiert. Die Zugabe von 200 µl Puffer P3 neutralisierte den Ansatz und fällte während 15-minütiger Inkubation auf Eis das SDS aus. Die niedermolekulare Plasmid-DNA

konnte unter diesen Bedingungen renaturieren. Nach Zugabe von 50 µl Chloroform wurden die Ansätze 20 min. zentrifugiert (20000 x g, 4°C). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die gelöste Plasmid-DNA mit 2/3 Vol. Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation (15', 20000 x g, 4°C) pelletiert. Abschließend wurde das Pellet in 800 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst.

P1 - Puffer:

Tris/ HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ ml (Zugabe nach Autoklavieren)

P2 - Puffer:

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v) (Zugabe nach Autoklavieren)

P3 - Puffer:

KOAc (pH 5,5 mit Essigsäure)	3 M
------------------------------	-----

4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. tricornutum*

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte in allen Fällen unter RNase-freien Bedingungen mit dem TRIZOL[®]-Reagent (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben.

4.3.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit gelöster DNA wurde photometrisch mit dem Photospektrometer ND-1000 (Nanodrop) bestimmt.

Bei RNA-Präparationen wurde zudem die Reinheit der Proben ermittelt. Über die Qualität von RNA-Präparation gibt die Quotienten aus OD₂₆₀ / OD₂₈₀ (für Proteinverunreinigungen) und OD₂₆₀ / OD₂₃₀ (für Verunreinigungen mit Salzen, Alkoholen und anderen Soluten) Aufschluss. OD₂₆₀ / OD₂₈₀-Verhältnisse zwischen 1,6 und 1,8 und OD₂₆₀ / OD₂₃₀-Verhältnisse > 2 zeugen von ausreichend sauberen RNA-Präparationen, die für weitere enzymatische Reaktionen verwendet wurden.

4.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die größenabhängige Auftrennung von DNA wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt, auf TBE-Agarosegele aufgetragen, und in Elektrophoresekammern mit 1 x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 - 200 V aufgetrennt. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,5-2% (w/v) gewählt. Die Visualisierung erfolgte durch im Gel enthaltenes Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, und im UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird.

10x TBE - Puffer:

Tris	1 M
Borsäure	0,83 M
EDTA	10 mM

TBE-Ladepuffer:

Harnstoff	4 M
Saccharose	50%
Na ₂ EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
Xylencyanol	0,1% (w/v)

4.3.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

In Agarosegelen aufgetrennte, distinkte Banden, wurden am UV-Illuminator zur Fluoreszenz angeregt, und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Elution erfolgte mit dem *JetSorb DNA Extraction* Kit (GENOMED) gemäß den Angaben des Herstellers.

4.3.7 Modifikation von Nukleinsäuren

4.3.7.1 Enzymatische Restriktion von DNA

Mithilfe von Restriktionsendonukleasen konnten DNA-Fragmente sequenzspezifisch geschnitten werden. Dies diente zum einen der Analyse von Restriktionsmustern mittels Gelelektrophorese, zum anderen zur Generierung kompatibler DNA-Strangenden für die anschließende Klonierung in entsprechend geschnittene Zielvektoren.

Ein Restriktionsansatz setzte sich in der Regel zusammen aus 50 ng - 1 µg DNA, Restriktionspuffer (abhängig vom jeweiligen Enzym, laut Herstellerangaben) und 1U der jeweiligen Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Die Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

4.3.7.2 Ligation von DNA

Mithilfe von T4-DNA-Ligase wurden eluierte DNA-Fragmente mit kompatiblen Einzelstrangenden ligiert. Dadurch konnten zum einen verschiedene Fragmente miteinander verknüpft werden, zum anderen DNA-Fragmente in kompatible Vektoren eingebracht werden. Ligationen erfolgten mit dem *Rapid DNA Ligation* Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben.

4.3.8 Transformationen und Transfektionen

4.3.8.1 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Top10-Zellen

Für die Transformation von *E. coli* wurden je 50 – 100 µl chemisch kompetente Zellen des Stamms Top10 auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 1' bei 42°C inkubiert und direkt wieder auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf LB-Medium mit geeigneten Selektionsmarkern.

4.3.8.2 Biolistische Transfektion von *P. tricornutum*

Mithilfe der biolistischen Transfektion lässt sich Fremd-DNA in verschiedene Organismen einbringen. Hierfür wird DNA an einem Trägermaterial immobilisiert, und im Vakuum mit hohem Druck auf Zellen geschossen. Bei einem geringen Prozentsatz der Zellen wird die eingebrachte DNA stabil in das Kerngenom integriert.

Für die biolistische Transfektion von *P. tricornutum* wurde mit einer Thoma-Zählkammer die Zellzahl einer ~1 Wochen alten Flüssigkultur mikroskopisch bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bei 1500 x g und Raumtemperatur für 10' zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Zellen mit f/2-Medium auf eine Dichte von 10⁹ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Kultur wurden je 100 µl entsprechend 10⁸ Zellen in der Mitte einer frischen f/2-Agarplatten in einer kreisrunden ca. 3 cm durchmessenden Fläche ausplattiert und angetrocknet.

Als Trägermaterial wurden Wolfram-Partikel M10 (BIO-RAD) mit einem Durchmesser von 0,7 µm verwendet. Für die Präzipitation der DNA an die Microcarrier wurden 50 µl sterile Partikel-Wasser-Suspension (entsprechend ca. 2,5 mg Microcarrier) mit 50 µl 2,5 M CaCl₂, 20 µl 0,1M Spermidin und 5-10 µg Plasmid-DNA in 5-10µl H₂O_{bid} gemischt und 1 min. bei Raumtemperatur gevortext. Nach zehnminütiger Sedimentation wurden die Partikel in 250 µl Ethanol_{abs} (HPLC Grade) aufgenommen und erneut gevortext. Die Partikel wurden wiederum

5' sedimentiert, das Ethanol entfernt, und das Sediment in 50 µl Ethanol_{abs} (HPLC Grade) resuspendiert.

Für die Transfektion wurde das „*Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System*“ von BIORAD verwendet. Das Gerät wurde vor Gebrauch gründlich mit Ethanol_{abs} (HPLC Grade) gereinigt. Pro Schuss wurden 10 µl der Wolframpartikel-Suspension auf die Mitte einer *Microcarrier*-Membran aufgetragen und luftgetrocknet. Die Membran sowie eine *rupture disc* und ein *stopping screen* wurde gemäß den Angaben des Hersteller installiert, eine geöffnete f/2-Agarplatte mit angetrockneter Algenkultur in die Apparatur eingelegt, und ein Vakuum von mindestens 25 psi angelegt. Bei Erreichen des Vakuums wurde durch einströmendes Helium Druck auf die der *Microcarrier*-Membran vorgeschaltete *rupture disc* ausgeübt. Bei Erreichen eines Drucks von 1350 psi zerreißt die *rupture disc*, was zu einer explosionsartigen Entladung des Drucks führt. Die Zellen auf der Agarplatte wurden dadurch mit beschleunigten Wolframpartikeln bombardiert, und die DNA somit in die Zellen eingebracht. Beschossene Agarplatten wurde für 24 h im Klimaschrank inkubiert. Zur Selektion ist im verwendeten Plasmid das Gen *sh ble* integriert, das Resistenz gegen das Antibiotikum Zeozin vermittelt, und während der 24-stündigen Inkubation in erfolgreich transfizierten Zellen exprimiert wird. Anschließend wurden die adherierenden Zellen mit 1 ml f/2-Medium abgespült, und die Algensuspension zu gleichen Teilen auf drei frische f/2-Agarplatten ausplattiert, die zu Selektionszwecken 75 µg/ml Zeozin enthielten. Die Platten wurden wie oben 14 Tage im Klimaschrank inkubiert, bis sich erste Kolonien transformierter Zellen bildeten.

4.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente wurde das *Phusion High-Fidelity PCR* Kit (Finnzymes) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden im *Mastercycler Gradient* bzw. *Mastercycler Personal* (Eppendorf) durchgeführt.

4.3.10 Herstellung von copyDNA (cDNA)

Um RNA-Transkripte für PCR-basierte Anwendungen nutzbar zu machen, müssen diese zunächst mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase von RNA in sogenannte copyDNA (cDNA), umgeschrieben werden. Die Herstellung von cDNA gliedert sich in die Degradation von DNA-Kontaminationen in RNA-Präparationen, die Aufreinigung der reinen RNA und die eigentliche Synthese.

4.3.10.1 DNA-Degradation von RNA-Präparationen durch DNase I

RNA wurde gemäß Kapitel 4.2.3 isoliert. Um die isolierte RNA gänzlich von DNA zu befreien, wurden je 5-10 µg RNA mit DNase I (Fermentas) gemäß Herstellerangaben behandelt.

4.3.10.2 Aufreinigung DNA-freier RNA

Um die DNase und andere Proteine möglichst quantitativ zu entfernen, wurde jeder Ansatz 2 x mit je 1 Vol. PCI gemischt und jeweils zur Phasentrennung für 10 min. bei 12000 x g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 1 Vol. Chloroform gemischt, um noch verbliebenes Phenol möglichst vollständig zu entfernen, und das Gemisch wie oben zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde dann mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol EtOH_{abs} bei -20°C die RNA gefällt. Das Pelletieren der RNA erfolgte bei 20000 x g und 4°C für 20 min. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und wie oben für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das RNA-Pellet getrocknet, und in 20 µl H₂O_{bid} gelöst.

4.3.10.3 cDNA Synthese

Die erhaltenen RNA-Präparationen wurden mittels randomisierter Hexanukleotide mit dem *SuperScript II First-Strand Synthesis Kit* in cDNA umgeschrieben, die dann als Template in anschließenden PCRs mit genspezifischen Primern diente, oder gewünschte Transkripte wurden alternativ mittels genspezifischer Primer und dem *OneStep RT-PCR Kit* direkt aus der RNA amplifiziert. In beiden Fällen wurde nach dem Protokoll des Herstellers Verfahren.

4.3.11 DNA-Sequenzierung mittels *Cycle-Sequencing*

Die DNA-Sequenzierung mittels *Cycle-Sequencing* beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Die Sequenzierungsreaktionen wurde mit dem *DYEnamic ET* Terminator Cycle Sequencing Kit* gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Entfernung überschüssiger Terminatoren wurden die Sequenzierungsprodukte mit je 26 µl H₂O_{bid} und 64 µl EtOH_{abs} versetzt, 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und für 20 min. bei 4°C und 20000x g pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und wie oben abzentrifugiert. Nach dem

Trocknen des Pellets an der Luft wurde es in 3 µl „*Formamide Loading Dye*“ (Amersham) aufgenommen und die Sequenzierprodukte im ABI-Prism 377 Sequenzierautomaten gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgelesen.

6,3 % Polyacrylamid-Gel:

Harnstoff	18 g
H ₂ O _{bid}	22,8 ml
Acrylamid	5,33 ml
10x TBE–Laufpuffer	6 ml
10% APS	300 µl
TEMED	20 µl

Die Analyse und Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 4.9 durchgeführt.

4.4 Proteinanalytik

4.4.1 Herstellung von nativem Proteingestamtextrakt aus *P. tricornutum*

Zur Herstellung nativer Proteinextrakte wurde ~1 Liter einer 1-2 Wochen alten *P. tricornutum*-Kultur 10 min. bei 1500 x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml SolA gewaschen und erneut pelletiert. Nach anschließender Resuspendierung des Pellets in 5 ml SolA wurde Proteinase Inhibitor Cocktail (PIC) im Verhältnis von 1:200 zugegeben (Endkonzentration 1 µg/ml je Inhibitor), und die Zellen in einer *FRENCH Press* (AMICO) unter einem konstanten Druck von 1400 psi aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt, um einen möglichst kompletten Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Intakte Zellen wurden im Anschluss durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C pelletiert und verworfen.

Solubilizing Buffer A (SolA):

Imidazol/HCl pH 7.5	50 mM
NaCl 2 mM 6-Amino Caproic Acid	50 mM
EDTA	1 mM
Succrose	8.5 %
PIC	1:200

PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail):

Antipain	50 µl (2 mg/ ml)
Chymostatin	20 µl (5 mg/ ml)
Aprotinin	50 µl (2 mg/ ml)
Trypsin – Inhibitor	20 µl (5 mg/ ml)
Na ₂ – EDTA	50 µl (2 mg/ ml)
Pepstatin	50 µl (2 mg/ ml)
Leupeptin	20 µl (5 mg/ ml)
Elastatinal	100 µl (1 mg/ ml)

Der Proteinase Inhibitor Cocktail wurde mit 140 µl HEPES/ KOH auf 500 µl aufgefüllt, so dass die einzelnen Inhibitoren in der Konzentration 200 µg/ ml vorlagen.

4.4.2 Fraktionierung von nativem Proteingestamtextrakt

Proteinrohextrakte können durch Ultrazentrifugation weiterhin separiert werden in Fraktionen, die den löslichen Proteinen, den peripheren Membranproteinen und den integralen Membranproteinen der Zelle entsprechen. Hierfür wurden je 2,4 ml nativer Rohextrakt in geeignete Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und die Membranen bei 4°C für 45'-60' und 45000 rpm abzentrifugiert (Rotor TFT 80.4). Der erhaltene Überstand entspricht den löslichen Proteinen der Zelle. Das Membranpellet wurde anschließend in 2,4 ml Carbonatpuffer resuspendiert und für 30' auf Eis inkubiert. Der hohe pH-Wert des Puffers bewirkt das

Ablösen peripherer Membranproteine von der Membran. Aus diesen Ansätzen wurden erneut die Membranen mit den integralen Membranproteinen wie oben abzentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten peripheren Membranproteinen wurde abgenommen, und die Membranpellets in 2,4 ml SolA resuspendiert. Für weitere Analysen wurden äquivalente Volumina der drei Fraktionen mittels TCA gefällt und abschließend in Harnstoffpuffer für 30' bei 37°C gelöst.

Carbonat Buffer:

NaHCO ₃ pH 11.5	100 mM
EDTA	1 mM
PIC	1:200

Harnstoffpuffer pH 6.8:

Harnstoff	8 mM
Tris/HCl	200 mM
EDTA	0,1 mM
SDS	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0.03 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)

4.4.3 Denaturierende Proteinfällung mit Tri-Chloressigsäure (TCA)

Zum Fällern von Proteinen wurde ein Aliquot einer Proteinlösung mit Tri-Chloressigsäure (TCA)-Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt (Endkonzentration 10-15%) und 30' auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10' bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Präzipitat in 800 µl eiskaltem Aceton gewaschen, und der Ansatz erneut für 2-3' wie oben zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis das Aceton nach dem Waschschrift klar blieb. Die Proteinpellets wurden dann getrocknet und in einer adäquaten Menge Harnstoffpuffer oder SDS-Probenpuffer gelöst.

TCA-Lösung:

70 % Tri-Chloressigsäure in Aceton

2x SDS-Probenpuffer:

Glycerin	20 % (v/v)
SDS	20 % (v/v)
Sammelgelpuffer	25 % (v/v)
Bromphenolblau	25 µg/ml
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)

4.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz

Bei der Amidoschwarz-basierten Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden 5-10 µl eines Proteinextraktes mit H₂O_{bid} auf 100 µl aufgefüllt, mit 400 µl Amidoschwarz-Färbelösung gemischt, und 20 min. bei 4°C und 20000 x g zentrifugiert. Die Färbelösung wurde entfernt, und das Pellet in 1 ml Waschlösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 1 ml 200 mM NaOH gelöst. Am Photometer wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge $\lambda = 615$ nm gemessen. Über den Vergleich mit einer vorher erstellten Eichgrade einer bekannten BSA-Proteinkonzentrationsreihe konnte aus der Absorption die Proteinkonzentration extrapoliert werden.

Amidoschwarz - Färbelösung:

Essigsäure	10% (v/v)
Methanol	90% (v/v)
Amidoschwarz	Spatelspitze

Amidoschwarz - Waschlösung:

Essigsäure	10% (v/v)
Methanol	90% (v/v)

4.4.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Acrylamidkonzentration der SDS-Gele wurde dem Molekulargewicht der Proteine von Interesse jeweils angepasst. Proteinproben in SDS-Probenpuffer wurden direkt vor Beladen des Gels für 10' bei 96°C denaturiert. SDS denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine masseabhängige negative Ladung. Alle Proteine einer Lösung erhalten somit ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis, und werden daher im Gel ausschließlich nach ihrer Masse aufgetrennt. Der Protein-Größenstandard wurde unbehandelt aufgetragen.

In die Elektrophoresekammer wurde 1x SDS-Laufpuffer gefüllt, und eine Spannung von 120-140V und eine Stromstärke von 20-40 mA angelegt.

4x Trenngelpuffer:

Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

4x Sammelgelpuffer:

Tris/HCl (pH 6,8)	500 mM
SDS	0,4 % (w/v)

10x SDS - Laufpuffer:

Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

Tabelle 4-1: Zusammensetzung und Trennbereiche verschiedenprozentiger SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel				Sammelgel
	8,5%	10%	12,5%	15%	
30 % (v/v) Acrylamid	2,8 ml	3,3 ml	4,1 ml	5,0 ml	0,9 ml
H ₂ O _{bid}	4,5 ml	4,0 ml	3,2 ml	2,3 ml	2,8 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1,25 ml
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	15 µl
10 % (w/v) APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	85 µl
Trennbereich [kDa]	50 - 200	30 - 120	25 - 100	10 - 60	-

4.4.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Proteinbanden in SDS-Gelen lassen sich mit kolloidalem Coomassie nachweisen. Die Gele wurden hierfür in eine Schale mit Coomassie-Färbelösung gelegt, und ü.N. bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Am Tag darauf wurde die Färbelösung entfernt, und die Gele mehrmals mit H₂O_{dest} gewaschen und schließlich ü.N. in H₂O_{dest} entfärbt.

Coomassie - Färbelösung:

Methanol	20 % (v/v)
Solution A	80 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	5 % (w/v)

Solution A:

ortho - Phosphorsäure	2 % (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 % (w/v)

4.4.7 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen und Immunodetektion (Western Blot)

Beim Western Blot werden Proteine im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung aus dem Gel auf eine Membran transferiert, und können dort im Anschluss mithilfe von spezifischen Antikörpern markiert und detektiert werden.

Für den Transfer wurde ein SDS-Gel sowie eine zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran und sechs Whatman-Papiere in Transferpuffer äquilibriert und anschließend in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinander in die *TE77 semi-dry transfer unit* (Amersham Biosciences) geschichtet. Die Apparatur wurde geschlossen, und die Proteine in 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² transferiert. Fertig geblottete Membranen konnten bei 4°C gelagert werden.

Für die Immunodetektion wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur in Blockingreagenz schüttelnd inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde ein antigenspezifischer erst-Antikörper i. d. R. im Verhältnis 1:5000 zugegeben und eine weitere

Stunde schüttelnd inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung entfernt, und die Membran dreimal je 15' mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen wurde der HRP-gekoppelte zweit-Antikörper, spezifisch für den F_c-Teil des Erst-Antikörpers, 1:10000 verdünnt in Blockingreagenz auf die Membran gegeben und wiederum 1 h schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde nochmals mit TBS-T wie oben gewaschen, sowie abschließend einmal mit TBS gespült.

Die Detektion des Immunkomplexes auf der Membran erfolgte vermittelt durch die an den zweit-Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish-Peroxidase*; HRP) durch Inkubation mit ECL-Lösung (*Enhanced Chemoluminescence*). Durch die dabei entstehende Lumineszenz wurden aufgelegte Röntgenfilme belichtet. Mit dem Entwickeln der Filme wurden die entsprechenden Signale sichtbar gemacht

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Blockingreagenz:

Magermilchpulver	7% (w/v) in TBS-T
------------------	-------------------

TBS:

Tris/ HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,1 % (v/v)

TBS - T:

Tris/ HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM

ECL-Lösung:

Luminol in DMSO	5 mM
Coomaric Acid in DMSO	0.8 mM
Tris/HCl (pH 8.5)	200 mM
Direkt vor der Detektion:	+ 30% H ₂ O ₂ 1:1000

4.4.8 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Hexa-Histidin- (6His-) Fusionsproteinen

Zur Expression rekombinanter 6His-Fusionsproteine wurden das pQE30-Vektorsystem (Quiagen) verwendet. Hierbei werden Zielgene so in den Vektor kloniert, dass diese unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-Tag exprimiert werden. Entsprechende Konstrukte wurden in den *E. coli* Expressionsstamm BL21-CodonPlus®(DER)-RIL transformiert.

Für die Überexpression wurden 50 ml LB_{Amp50} mit 20 µl BL21-Zellen beimpft, und die Kultur ü.N. bei 37°C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am Folgetag 1 l LB-Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,2 angeimpft, und bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 1 erreicht war. Dann erfolgte die Induktion der Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG in die Kultur. Es wurde weiter für 3 h inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation (5', 8000 x g, 4°C) geerntet wurden. Das Zellpellet konnte ggf. schockgefroren und bei -20°C gelagert werden.

Die Zellen wurden in 20-30 ml Lyse-Puffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung lysiert (3 x 10', 50% Leistung). Aus dem Lysat wurden unlösliche Einschlusskörperchen, zu denen Überexpressionsprodukte meist aggregieren, durch Zentrifugation pelletiert (20000 x g, 4°C, 30') und anschließend einmal in Detergenz-Puffer, zweimal in Triton-Puffer und einmal in Tris-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die gewaschenen Einschlusskörperchen in Aufschluss-Puffer ü.N. schüttelnd gelöst.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte anschließend über zwei verschiedene Chromatographiesäulen. In einem ersten Schritt wurden die Proteine mittels ihres 6-His-*Tags* über eine Nickel-NTA-Säule gemäß Herstellerangaben aufgereinigt (Ni-NTA Superflow, QIAGEN). An das Säulenmaterial gebundene Proteine wurden hierfür zweimal mit je 10 ml Waschpuffer 1 und zweimal mit je 10 ml Waschpuffer 2 gewaschen und schließlich mit 3 ml Elutionspuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden weiter über eine Ionenaustauschchromatographie (Mono S, GE-Healthcare) mit einem Gradienten von 50 mM bis 1 M NaCl (in 20 mM Tris/HCl (pH 7), 6 M Urea) aufgereinigt.

Lyse-Puffer:

Tris/HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
DTT	1 mM
Triton-X 100	0,5% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 mM
Lysozym	2 mg/ml

Detergenz-Puffer:

Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	200 mM
Desoxycholsäure	10 mg/ml
Nonidet P 40	10 mg/ml
β-Mercaptoethanol	10 mM

Triton-Puffer:

Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM
EDTA	1 mM
Triton-X 100	0,5% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 mM

Tris-Puffer:

Tris/HCl (pH 8)	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	10mM

Aufschluss-Puffer:

Harnstoff	8 M
NaCl	150 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM

Waschpuffer 1:

Urea	8 M
NaCl	150 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Triton-X 100	2%

Waschpuffer 2:

Urea	8 M
NaCl	1 M
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imidazol	15 mM

Elutionspuffer:

Urea	8 M
NaCl	150 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imidazol	500 mM

4.4.9 Rekonstitution von Kanalproteinen in Proteoliposomen

Unter geeigneten Bedingungen lassen sich heterolog exprimierte Membranproteine *in vitro* in Liposomen inkorporieren. Die Rekonstitution erfolgte nach dem Protokoll von Ertel und Kollegen (Ertel *et al.*, 2005). Hierfür wurden zu den gemäß Kapitel 4.4.8 aufgereinigten Proteinen das Detergenz Mega-9 (Endkonzentration 80 mM) zugegeben, um diese zu solubilisieren. Parallel wurde das Lipid L- α -Phosphatidylcholin in 80 mM Mega-9 (in 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0) gelöst. Beide Lösungen wurden zusammengeführt, gründlich gemischt und mindestens 10 min. bei RT inkubiert. Das Verhältnis von Lipid- zu Proteinkonzentration wurde dabei auf ungefähr 20:1 eingestellt, um die Anzahl der rekonstituierten Proteine pro Liposom zu minimieren. Während der Inkubationszeit erfolgt die Inkorporation der Proteine in Mischmizellen aus Detergenz und Lipid. Um das Detergenz und den Harnstoff nachfolgend zu entfernen, wurde der Ansatz gegen 2 l Dialysepuffer für 2 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch Carl Roth GmbH; Ausschlussgröße: 3500 Da). Die gebildeten Proteoliposomen wurden zu je 50 μ l aliquotiert, und konnten nach schockgefrieren in flüssigem N₂ bei -80 °C gelagert werden. Vor der Verwendung wurden die Proteoliposomen ca. 10'' im Ultraschallbad sonifiziert, um kleinere Vesikel zu erhalten.

Dialysepuffer

KCl	10 mM
MOPS/Tris (pH 7,0)	10 mM

Die Proteinexpression, -aufreinigung und -rekonstitution in Proteoliposomen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Schleiff (Göthe-Universität Frankfurt) von Dr. Rolf Bredemeier und Raimund Haar durchgeführt.

4.5 Weitere Methoden

4.5.1 Elektrophysiologische Messungen an rekonstituierten Membranproteinen in artifiziellen Biomembranen

Viele Membranproteine sind in der Lage, konstitutiv oder temporär Kanäle in biologischen Membranen zu bilden. Kanalproteine unterscheiden sich voneinander hinsichtlich verschiedener elektrophysiologischer Parameter, wie z.B. ihrer Ionenselektivität, ihres Schaltverhaltens und ihres Leitwertes. Mithilfe geeigneter elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden ist es möglich, derartige Parameter zu bestimmen und zu vergleichen.

Eine solche Methode stellt unter anderem die sogenannte *Lipid-Bilayer*-Technik dar, bei der eine artifizielle Biomembran über der Öffnung eines Teflonseptums gebildet wird (Miller & Racker, 1976). Das Septum trennt zwei Halbkammern, die mit verschiedenen Elektrolytlösungen befüllt werden.

Durch Verwendung unterschiedlicher Ionenkonzentrationen wird ein elektrochemischer und osmotischer Gradient über der Membran aufgebaut. Durch den osmotischen Gradienten und die Zugabe bivalenter Kationen wie z.B. Ca^{2+} wird die Fusion von zugegebenen Proteoliposomen, in die aufgereinigte Kanalproteine inkorporiert sind, mit der Membran begünstigt: Aufgrund des osmotischen Gradienten strömt Wasser in das Proteoliposom ein. Durch das hiermit verbundene Anschwellen fusioniert das Liposom mit der Membran, wobei die Kanalproteine des Proteoliposoms in die Membran integriert werden.

Aufgrund ihrer hydrophoben Kernregion stellt eine Biomembran eine elektrisch isolierende Barriere dar, über die durch Anlegen einer Spannung zwar ein elektrisches Potential aufgebaut werden kann, durch die aber kein Stromfluss stattfinden kann. Findet hingegen der Einbau eines Kanalproteins in die Membran statt, entsteht eine elektrische Verbindung zwischen beiden Halbkammern, und entsprechende Stromflüsse können durch Messelektroden in den beiden Halbkammern gemessen werden. Der Stromfluss ist abhängig von der angelegten Spannung und ist direkt proportional zum reziproken Wert des Kanalwiderstandes, dem sogenannten Leitwert. Der Widerstand seinerseits ist direkt von den Eigenschaften der Proteinpore abhängig wie z.B. dessen Durchmesser und der Ladungsverteilung im Inneren des Kanals.

Wird also eine definierte Spannung an die Membran angelegt, können aus den resultierenden Stromflüssen der Leitwert und andere Eigenschaften eines Kanalproteins, sowie der Einfluss verschiedenere Effektoren, bestimmt werden.

Die Bildung des planaren Lipid-Bilayers erfolgte nach Müller *et al.* (Müller *et al.*, 1963). Dafür wurde die Gesamtkammer mit Elektrolytlösung I gefüllt und ein Tropfen Lipidlösung (~130 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin in n-Dekan) auf das Loch im Teflonseptum appliziert.

Nach Ausbildung eines stabilen Bilayers wurde die Lösung in der *trans*-Halbkammer gegen Elektrolytlösung II ausgetauscht und 10mM CaCl₂ in die *cis*-Halbkammer zugegeben, um die Proteoliposomenfusion zu ermöglichen. 10 μ l Proteoliposomensuspension wurden in die *cis*-Halbkammer direkt unterhalb des Bilayers appliziert, um die Liposomen in engen Kontakt mit dem Bilayer zu bringen. Nach erfolgter Fusion wurden die Salzlösungen in den Halbkammern sofort durch Perfusion gegen frische Salzlösungen ausgetauscht, um die Fusion weiterer Proteoliposomen zu verhindern.

Die Elektrode der *trans*-Halbkammer war direkt mit der *Headstage* eines Stromverstärkers (GeneClamp500B, Axon Instruments) verbunden. Die verstärkten Stromflüsse wurden mit der pCLAMP9.2-Software (Axon Instruments) aufgezeichnet und ausgewertet.

Elektrolytlösung I

MOPS/Tris (pH 7)	10 mM
KCl	250 mM

Elektrolytlösung II

MOPS/Tris (pH 7)	10 mM
KCl	20 mM

4.5.1.1 Bestimmung des Umkehrpotentials

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials U_{rev} eines Kanalproteins werden die Halbkammern mit unterschiedlich konzentrierten Elektrolytlösungen befüllt (*cis/trans* = 250 mM/20 mM KCl) und Spannungsrampen an die Messkammer angelegt. Das heißt, die Kommandospannung U_{com} wird linear verändert, und der resultierende Stromfluss gemessen. Ausgehend vom Startpotential -50 mV wurde U_{com} mit einer Rate von 10 mV/s bis auf ein Endpotential von +100 mV angehoben. Die gemessenen Stromstärken wurden aufgezeichnet und in Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufgetragen. Der Punkt, an dem die resultierende Gerade die Abszisse schneidet spiegelt die Spannung wieder, an der der Nettostromfluss durch die Pore = 0 ist.

4.5.1.2 Berechnung der Ionenselektivität

Aus dem Umkehrpotential U_{rev} kann die Ionenselektivität eines Kanalproteins mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung (Formel 1) bestimmt werden (Hille, 2001). Für die hier verwendete KCl-Lösung ergibt sich

$$U_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{P_K [K]_{cis} + P_{Cl} [Cl]_{trans}}{P_K [K]_{trans} + P_{Cl} [Cl]_{cis}} \quad (1)$$

mit U_{rev} = Umkehrpotential des Kanalproteins, R = universelle Gaskonstante, T = absolute Temperatur, F = Faraday-Konstante, P_x = Permeabilität des Ions x und $[x]_{cis,trans}$ = Konzentration des Ions x in der *cis*- bzw. *trans*-Halbkammer.

Durch Umformung dieses Terms erhält man für die Selektivität eines Kanalproteins Formel 2:

$$\frac{P_K}{P_{Cl}} = \frac{[Cl]_{trans} - [Cl]_{cis} \cdot e^{\frac{U_{rev} \cdot F}{R \cdot T}}}{[K]_{trans} \cdot e^{\frac{U_{rev} \cdot F}{R \cdot T}} - [K]_{cis}} \quad (2)$$

4.5.1.3 Leitwertmessungen

Der spezifische Leitwert g von Kanalproteinen kann durch Messungen unter symmetrischen Bedingungen bestimmt werden, das heißt, *cis*- und *trans*-Halbkammer weisen die gleiche Ionenstärke auf (*cis/trans* = 250 mM/250 mM KCl).

Die Stromstärkendifferenz ΔI bei Schaltereignissen wird dabei in Abhängigkeit zur angelegten Kommandospannung U_{com} bestimmt und in einem Strom-Spannungs-Diagramm (U-I-Diagramm) aufgetragen. Nach dem Ohm'schen Gesetz kann aus der linearen Steigung der Messpunkte der Leitwert des Kanalproteins aus Gleichung 3 bestimmt werden:

$$g = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{U_{com}} \quad (3)$$

4.5.1.4 Berechnung des Kanaldurchmessers

Aus den gemessenen Kanalleitwerten kann die Porengröße nach Formel 4 näherungsweise bestimmt werden (Hille, 1992; Hinnah *et al.*, 2002):

$$d = \frac{\rho \cdot g}{\pi} \left(\frac{\pi}{2} + \sqrt{\left(\frac{\pi}{2} \right)^2 + \frac{4 \cdot \pi \cdot l}{\rho \cdot g}} \right) \quad (4)$$

mit d = Porendurchmesser, ρ = spezifischer elektrischer Widerstand des Elektrolyts, g = Kanalleitwert und l = Länge der Konstriktionszone des Kanals.

Für l wird ein Wert von 5 Å angenommen. Der elektrische spezifische Widerstand der eingesetzten 250 mM KCl- Lösung beträgt 49,5 Ωcm. Unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors von Smart *et al.* ergibt sich für die KCl-Lösung ein spezifischer elektrischer Widerstand von $\rho = 247,5 \text{ Ωcm}$ (Smart *et al.*, 1997).

Sämtliche elektrophysiologischen Messungen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Schleiff (Göthe-Universität Frankfurt) von Dr. Rolf Bredemeier und Raimund Haar durchgeführt.

4.5.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation rekombinanter GFP-Fusionsproteinen in *P. tricornutum* wurden entsprechende transgene Zellen mit dem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 untersucht.

Als Objektive wurden ein HCX PL APO 40x/1,25-0,75 Oil CS oder ein PL APO 63x/1,32-0,60 Oil Ph3 CS Öl-Immersions-Objektiv verwendet. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz und der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte mit einem Argon/Krypton Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Verwendung von zwei verschiedenen Photomultipliern ermöglichte die Detektion von Fluoreszenzen in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen. Die GFP-Emission wurde im Grünbereich bei 500-520 nm aufgezeichnet, die Chlorophyll-Emission im langwelligeren Rotbereich bei 625-720 nm. Am KLSM erstellte Bilder wurden mit der Software *LCS Lite* bearbeitet.

5 Ergebnisse

Wie einleitend beschrieben, ist bisher unbekannt, wie stromale Proteine über die drittäußerste Membran der komplexen Plastiden von Chromalveolaten transportiert werden. 2007 identifizierten Wunder *et al.* erstmals ein im Genom der Heterokontophyte *P. tricornutum* codiertes Protein, dass ein putatives POTRA-Motiv besitzt, und somit als putatives Omp85-Homolog klassifiziert wurde (Wunder *et al.*, 2007). Im Folgenden wird dieses Protein daher ptOmp85 benannt.

ptOmp85 (Identifikationsnummer 46881, *P. tricornutum* Genomdatenbank) ist auf Chromosom 11 des Kerngenoms codiert, das entsprechende Gen ist insgesamt 2162 Bp lang. Ein aus vorhandenen EST-Daten erstelltes Genmodell sagt ein Intron von 88 Bp voraus, der offene Leserahmen ist also insgesamt 2074 Bp lang. Die aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz kalkulierte Masse des Proteins beträgt ungefähr 75 kDa.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen an ptOmp85 dargestellt.

5.1 *In silico*-Analyse

5.1.1 Die Analyse der Primärsequenz von ptOmp85 impliziert eine stromale Lokalisation

Die Analyse der abgeleiteten ptOmp85-Aminosäuresequenz mit SignalP identifizierte mit äußerster Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren Länge am N-Terminus mit einer Schnittstelle A-F (P = 100%). Die weitere Analyse der Sequenz ohne das N-terminale Signalpeptid mit TargetP identifizierte eine mitochondrielle Präsequenz von 99 Aminosäuren Länge. Allerdings sind sowohl TargetP als auch andere gängige Analyseprogramme zur Identifizierung von Transitpeptiden bisher ausschließlich an Pflanzensequenzen trainiert. Transitpeptide von Heterokontophyten werden daher oftmals nicht als solche erkannt oder als mitochondrielle Präsequenzen fehlinterpretiert. Diese Präsequenzvorhersage in Verbindung mit dem identifizierten Signalpeptid, ließ den Schluss zu, dass das Protein tatsächlich über eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS) für den plastidären Import verfügt. An der +1-Position des vermuteten Transitpeptides findet sich demnach ein Phenylalanin (F), was das Protein für den stromalen Import markiert.

5.1.2 Modellierung eines dreidimensionalen Proteinmodells

Mithilfe multipler Aminosäurealignments mit verschiedenen Proteinen der Omp85-Familie und durch Sekundärstrukturvorhersagen auf Grundlage bekannter Omp85-Strukturen war es möglich, ein dreidimensionales Homologie-Modell des putativen Omp85-Homologs ptOmp85 aus *P. tricornutum* am Computer zu erstellen. Hierbei konnte eine typische POTRA-Domäne in der N-terminalen Hälfte zwischen den Aminosäuren 153 und 348 des Proteins modelliert werden. Innerhalb der Domäne konnten zwei distinkte POTRA-Motive identifiziert werden, wobei das erste eine klassische β_1 , α_1 , α_2 , β_2 , β_3 -Struktur aufweist. POTRA-Motiv 2 besitzt hingegen im Bereich der Aminosäuren 216 bis 266 einen ungewöhnlichen Aminosäureabschnitt zwischen β -Faltblatt 1 und α -Helix 1, der in dieser Form bisher nicht bei Omp85-Proteinen beobachtet wurde, und daher auch nicht erfolgreich modelliert werden konnte.

Verschiedene β -barrel-Vorhersageprogramme waren nicht in der Lage, eine β -barrel-Domäne in der ptOmp85-Sequenz zu identifizieren. Nach der Identifizierung der beiden POTRA-Motive war es jedoch durch manuelle Analyse möglich, die C-terminale Hälfte des Proteins tatsächlich als β -barrel-Domäne zu identifizieren. Diese bildet eine typische Fassstruktur aus 16 anti-parallel orientierten β -Faltblättern, wie es für Omp85-Proteine typisch ist.

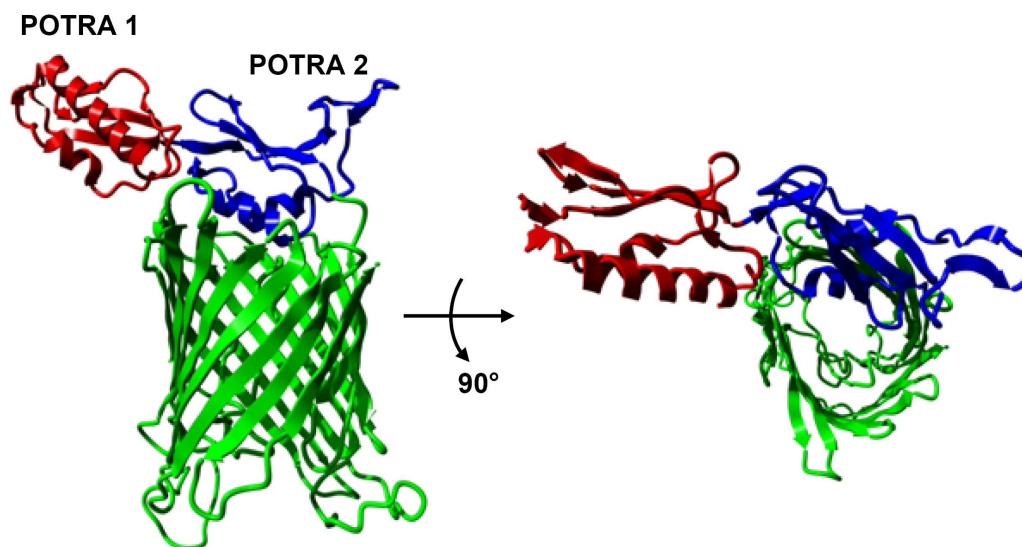


Abb. 5-1: Dreidimensionales Homologie-Modell von ptOmp85 in Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts).

Anhand des Homologie-Modells konnten zwei N-terminale POTRA-Motive (rot bzw. blau) identifiziert werden. Die C-terminale Hälfte des Proteins bildet einen β -barrel aus 16 anti-parallel orientierten β -Faltblättern (grün).

5.1.3 ptOmp85-Homologe können in anderen Chromalveolaten identifiziert werden

Mithilfe der im *P. tricornutum*-Genom codierten Omp85-Sequenz war es möglich, die Genome weiterer Chromalveolaten-Spezies nach putativen ptOmp85-Homologen zu durchsuchen. Als frei zugängliche Datenbanken sind die Genome der Diatomee *Thalassiosira pseudonana*, der Haptophyte *Emiliania huxleyi* sowie der Apicomplexen *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* verfügbar. Tatsächlich war es möglich, mittels BLAST-Verfahren in allen diesen Genomen putative Homologe von ptOmp85 zu identifizieren. Für die Omp85-Homologen von *T. pseudonana* und der beiden Apicomplexen konnten vollständige Genmodelle erstellt werden, die im Fall der Apicomplexen-Sequenzen zudem auf Transkriptebene mittels RT-PCR und Sequenzierung bestätigt werden konnten. Am N-Terminus dieser drei Proteine wurden zudem putative Zielsteuerungssequenzen für den plastidären Import identifiziert. Beim Homolog aus *E. huxleyi* konnte hingegen nicht der vollständige offene Leserahmen identifiziert werden, da hier kaum EST-Daten zum betreffenden Genlocus vorhanden waren. So konnte zwar eine eindeutige POTRA-Domäne im entsprechenden Protein identifiziert werden, der korrekte N-Terminus blieb hingegen unbekannt, so dass hier nicht ermittelt werden konnte, ob auch dieses Protein eine plastidäre Zielsteuerungssequenz besitzt.

5.1.4 Die Omp85-Homologen der Chromalveolaten zeigen Verwandtschaftsbeziehungen zu Omp85-Proteinen des Toc75-Typs

Die erhaltenen Sequenzen der putativen Chromalveolaten-Omp85-Proteine wurden anschließend zusammen mit weiteren bakteriellen, cyanobakteriellen, mitochondriellen und plastidären Vertretern der Omp85-Familie (siehe Tabelle 5-1) einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Das Homolog aus *P. falciparum* wurde hierbei ausgeklammert, da dessen Aminosäuresequenz aufgrund des hohen A-T-Gehalts des *P. falciparum*-Genoms verzerrt ist (Gardner *et al.*, 2002).

Hierbei zeigt sich, dass sich sämtliche Omp85-Proteine deutlich in zwei Hauptäste aufteilen, wobei der eine Ast ausschließlich proteobakterielle und mitochondrielle Omp85-Proteine vereint (Sam50-Typus), während im anderen die cyanobakteriellen und plastidären Omp85-Proteine gruppieren (Toc75-Typus). Die Omp85-Homologen der Chromalveolaten bilden hierbei deutlich eine gemeinsame Klade im Ast des Toc75-Typus. Die nächste phylogenetische Verwandtschaft innerhalb dieses Astes zeigt diese Klade zum Toc75-Protein der freilebenden Rotalge *Cyanidioschyzon merolae*.

Tabelle 5-1: Omp85-Proteine verschiedener Spezies

Angegeben sind der Name der jeweiligen Sequenz, die Ursprungsspezies, die entsprechende Bezeichnung in Abb. 5-2 und die Genidentifikationsnummer (NCBI GenBank).

Omp85-Protein	Spezies	Bezeichnung in Abb. 5-2	Genidentifikationsnummer
Putatives apicoplastidäres Omp85-Homolog	<i>Toxoplasma gondii</i>	Tgon	gi 237833148
Putatives plastidäres Omp85-Homolog	<i>Emiliana huxleyi</i>	Ehux	fgenesHEH_pg.8__212/ fgenesHEH_pg.16__130*
Putatives plastidäres Omp85-Homolog	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Tpse	GU203520
Putatives plastidäres Omp85-Homolog	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	ptOmp85	GU203519
Rhodophyten Toc75-Homolog	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	CmerP	CMJ202C [§]
Chloroplastidäres Toc75-V	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Toc75-V	gi 18419973
Cyanobakterielles Omp85	<i>Anabaena sp. PCC 7120</i>	aOmp85	gi 17229761
Chloroplastidäres Toc75-III	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Toc75-III	gi 15232625
Bakterielles Omp85	<i>Thermus thermophilus</i>	Tthe	gi 55980530
Bakterielles Omp85	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fnuc	gi 19705216
Bakterielles Omp85	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	Cpha	gi 67938686
Mitochondrielles Sam50	<i>Xenopus laevis</i>	Sam50	gi 38014784
Mitochondrielles Sam50	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AthaM	gi 18414910
mitochondrielles Sam50-Homolog	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	CmerM	CMO061C [§]
Bakterielles Omp85	<i>Campylobacter lari</i>	Clar	gi 57240748
Bakterielles Omp85	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Ddes	gi 23475818
Bakterielles Omp85	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Rrub	gi 48764608
Bakterielles Omp85	<i>Neisseria meningitidis</i>	Omp85	gi 2460281
Bakterielles Omp85	<i>Escherichia coli</i>	BamA	gi 1786374
Putatives Apicoplastidäres Omp85-Homolog	<i>Plasmodium falciparum</i>	Pfal	GU203521 [§]

Identifikationsnummern, die mit * oder [§] markiert sind, beziehen sich auf die Speziesspezifischen Genomdatenbanken von *E. huxleyi* (<http://genome.jgi-psf.org/Emihu1/Emihu1.home.html>) bzw. *C. merolae* (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>).

[§]: Die *P. falciparum*-Sequenz wurde nicht in die phylogenetische Analyse miteinbezogen, da deren Aminosäuresequenz aufgrund des hohen A-T-Gehalts des *P. falciparum*-Genoms verzerrt ist.

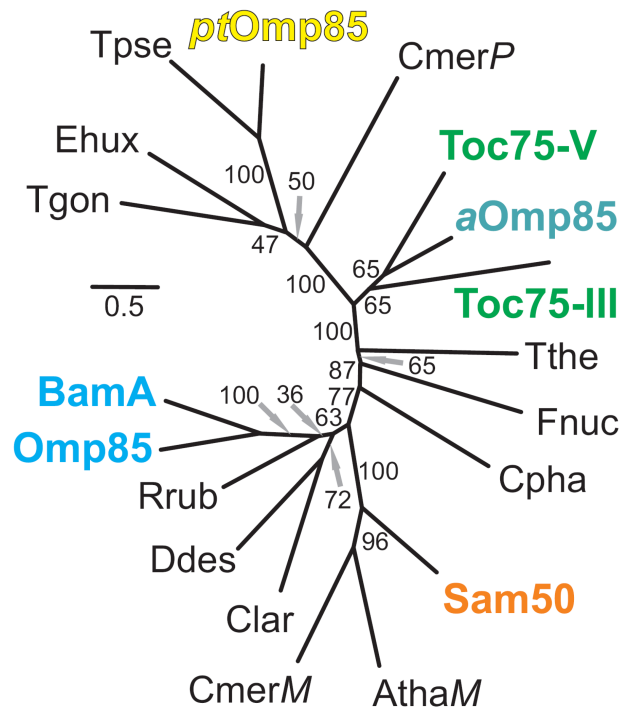


Abb. 5-2: Phylogenetische Analyse der identifizierten Chromalveolaten-Omp85-Homologe mit bekannten Omp85-Proteinen.

Der ermittelte phylogenetische Baum offenbart eine klare Trennung von Sam50- und Toc75-artigen Omp85-Proteinen. Die Homologen der Chromalveolaten bilden eine gemeinsame Klade im Ast der Toc75-artigen. Die nächste Verwandtschaft zeigt sich zum Toc75-Homolog der freilebenden Rotalge *Cyanidioschyzon merolae*.

Die Zahlen an den Verzweigungstellen geben den jeweiligen *Bootstrap support* an. Der Maßstab entspricht 500 Millionen Jahren.

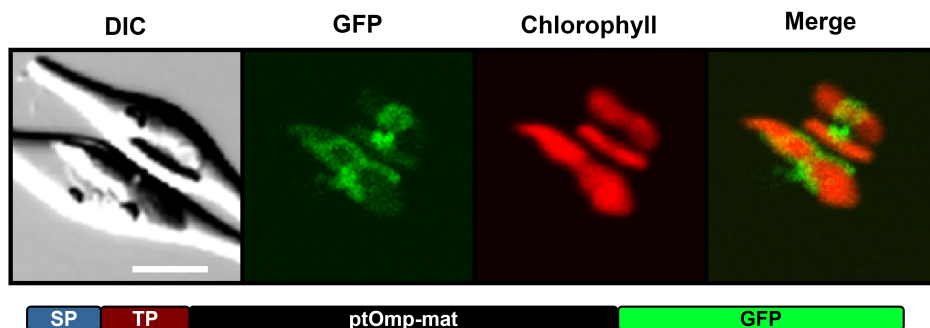
5.2 *In vivo*- und *in vitro*-Lokalisationsstudien

5.2.1 ptOmp85 lokalisiert in der komplexen Plastiden von *P. tricornutum*

Zur Klärung, ob die *in silico* identifizierte N-terminale Extension tatsächlich eine funktionelle BTS für den plastidären Proteinimport darstellt, wurden GFP-Fusionskonstrukte zum einen mit dem volle-Länge-Protein (ptOmp85-FL-GFP) und zum anderen mit der vorhergesagten, ca. 120 Aminosäure langen BTS (ptOmp85-BTS-GFP) generiert. Die Konstrukte wurden in den Zielvektor pPha-NR hinter den Nitratreduktase -Promotor kloniert, so dass die Expression der Konstrukte durch den Austausch von Ammonium (NH₄) zu Nitrat (NO₃) im Medium induziert werden konnte. Die Analyse erfolgreich transfizierter Klone erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (KLSM). Nach Induktion der Expression von ptOmp85-FL-GFP bzw. ptOmp85-BTS-GFP zeigte sich, dass beide Fusionsproteine wie vorhergesagt in der

komplexen Plastide von *P. tricornutum* lokalisieren (Siehe Abb. 5-3). Die Fluoreszenz akkumuliert hierbei in einer Region, die das Stroma der Plastide (zu erkennen an der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls) in einem schmalen Streifen umgibt. Mitunter wiesen die Lokalisationsmuster auch Ähnlichkeiten zu GFP-Fusionsproteinen auf, die im periplastidären Kompartiment (PPC) der Plastide lokalisiert sind, und hier eine sogenannte „Blob“-ähnliche Struktur bilden (Gould *et al.*, 2006). Die klare Abgrenzung von GFP- und Chlorophyllfluoreszenz zeigt, dass die Proteine nicht über alle vier Membranen bis ins Stroma transportiert wurden.

ptOmp-FL-GFP



ptOmp-BTS-GFP

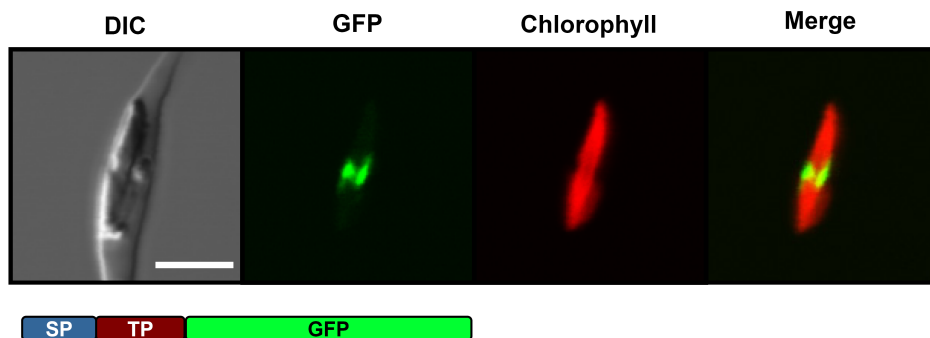


Abb. 5-3: *In vivo*-Lokalisation von ptOmp85

GFP wurde entweder an das volle-Länge ptOmp85-Protein (ptOmp-FL-GFP) oder an die vorhergesagte BTS (ptOmp-BTS-GFP) fusioniert und in *P. tricornutum* exprimiert. Die Überlagerung (*Merge*) der GFP-Fluoreszenz (grün) und der stromalen Chlorophyllfluoreszenz (rot) zeigt eine Lokalisation des Fusionsproteins um das Stroma herum (oben), oder stellt sich bisweilen dar wie bekannte GFP-Lokalisationen im PPC (sog. „Blob“-ähnliche Struktur; unten). Der Maßstab entspricht 5 μm .

5.2.2 ptOmp85 ist ein integrales Membranprotein

Omp85-Proteine werden mittels ihrer β -barrel-Domäne in ihrer Zielmembran verankert. Da das *in silico*-Modell eine solche β -barrel-Domäne auch für ptOmp85 voraussagte, wurde eine mögliche Membraninsertion analysiert. Hierfür wurden Zellen, die das ptOmp85-FL-GFP-Fusionsprotein exprimierten, geerntet und aufgeschossen. Der erhaltene Proteinrohextrakt wurde mittels Ultrazentrifugation und Carbonatextraktion subfraktioniert in lösliche Proteine, periphere Membranproteine und integrale Membranproteine. Proben der drei Fraktionen wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, und im Western Blot analysiert. Die Detektion mit einem spezifischen anti-GFP-Antikörper zeigte Signale ausschließlich in der Fraktion der integralen Membranproteine im Bereich der abgeschätzten Größe des Fusionsproteins von ca. 95-100 kDa (siehe Abb.5-4). Zur Kontrolle der Integrität der einzelnen Fraktionen wurden diese im Western Blot zudem mit einem anti-PsbO-Antikörper analysiert. Hierbei wurde ein Signal ausschließlich, wie erwartet, in der Fraktion löslicher Proteine detektiert. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt ein spezifisches Artefakt der GFP-Fusion darstellt, wurden die gleichen Analysen zudem mit dem ptOmp85-BTS-GFP-Klon durchgeführt, der lediglich ein Fusionsprotein aus der vorhergesagten ptOmp85-BTS und GFP exprimiert. Die Western Blot-Analyse entsprechender Proteinfraktionen dieses Klons zeigte, dass das Fusionsprotein hier ausschließlich in der Fraktion löslicher Proteine zu detektieren ist.

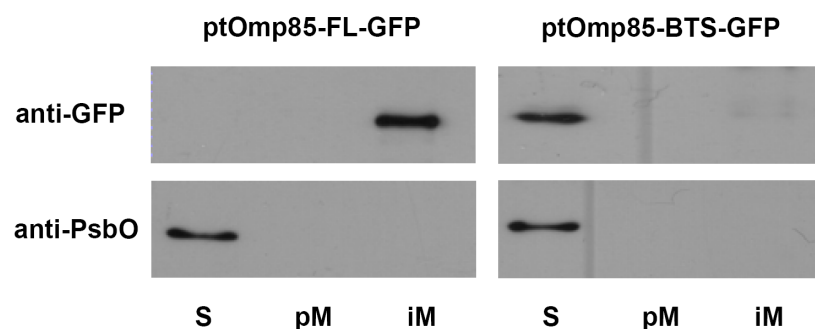


Abb. 5-4: Analyse der Membranintegration von ptOmp85-FL-GFP

Klone, die die in Abb. 5-3 gezeigten GFP-Fusionsproteine exprimieren wurden geerntet und lysiert. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden fraktioniert in lösliche Proteine (S), periphere Membranproteine (pM) und integrale Membranproteine (iM). Western Blot Analysen der verschiedenen Fraktionen mit einem anti-GFP Antikörper zeigen, dass das volle-Länge Fusionsprotein ausschließlich in der integralen Membranfraktion detektiert wird, nicht aber das ptOmp85-BTS-GFP Fusionsprotein. Zur Kontrolle wurden die Fraktionen mit einem anti-PsbO Antikörper analysiert. Hier wurden bei beiden Klonen ausschließlich Signale in der löslichen Fraktion detektiert.

5.2.3 ptOmp85 zeigt einen intraorganellären zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus

Obwohl sowohl die beobachtete Lokalisation als auch die Membraninsertion des ptOmp85-Proteins den Vorhersagen entsprachen, ergab sich hierbei dennoch ein zunächst unerwarteter Widerspruch. So findet sich an der +1-Position des Transitpeptides von ptOmp85 ein Phenylalanin. Wie einführend erwähnt, ist ein solches Phenylalanin das entscheidende Zielsteuerungssignal für einen Proteinimport über die beiden inneren Plastidenmembranen ins Stroma. Wie Abb. 5-3 zeigt, lokalisiert ptOmp85 aber eindeutig außerhalb des Plastidenstromas. Dieser vorläufige Widerspruch könnte allerdings mit Blick auf das pflanzliche Omp85-Homolog aus Chloroplasten, Toc75, erklärt werden. Durch eingehende biochemische Analysen an Chloroplasten aus *Pisum sativum* ist bekannt, dass hier Toc75 (psToc75) einem komplexen Importmechanismus in zwei Schritten folgt. psToc75 besitzt dafür zwei distinkte Zielsteuerungselemente am N-Terminus (Tranel & Keegstra, 1996). Das erste ist ein „klassisches“ Transitpeptid für den stromalen Import, das zweite ist ein poly-Glycin-Motiv (G-G-G-A-G-G-G-G-G), das als intra-organelläre Zielsteuerungssequenz dient (Inoue & Keegstra, 2003). Das Transitpeptid vermittelt hierbei zunächst den Import des psToc75-Vorläuferproteins in das Stroma des Chloroplasten. Im Stroma erfolgt die Abspaltung des Transitpeptides durch die stromale Prozessierungspeptidase, so dass nun das poly-Glycin-Motiv N-terminal vorliegt. Dieses Motiv vermittelt auf bisher noch ungeklärte Weise eine Relokalisierung des Proteins in den Intermembranraum (IMS) zwischen innerer und äußerer Membran, wo es schließlich durch die Aktivität der plastidären Typ I Signalpeptidase 1 (pl-SP1) an einer konservierten Signalpeptidase 1-Erkennungssequenz (A-X-A (Nielsen *et al.*, 1997)) abgespalten wird (Inoue *et al.*, 2005). Abschließend wird psToc75 in die äußere Chloroplastenmembran integriert.

Aufgrund der bisher aufgedeckten Ähnlichkeiten zwischen Toc75 und ptOmp85 könnte man einen vergleichbaren zwei-Schritt Importmechanismus auch für ptOmp85 vermuten, der gleichzeitig das Phenylalanin an der +1-Position des Transitpeptides erklären würde. Um diese Frage zu klären, wurde zunächst erneut die ptOmp85-Primärsequenz analysiert, um ein vergleichbares poly-Glycin-Motiv zu identifizieren. Erschwert wurde dies durch den Umstand, dass die tatsächliche Länge des Transitpeptides unbekannt war, so dass der gesamte Bereich zwischen dem Signalpeptid und dem ersten POTRA-Motiv (=132 Aminosäuren) untersucht wurde. Hierbei zeigte sich, dass zwar vereinzelt Glycine über diesen Bereich verteilt waren, ein zu psToc75 vergleichbares poly-Glycin-Motiv fehlte aber. Auffällig war lediglich ein tripel-Glycin-Motiv an Position 90-92 des Proteins, denn dieses Motiv konnte nicht nur im Protein aus *P. tricornutum*, sondern auch in einem vergleichbaren Bereich des homologen

Proteins aus *T. pseudonana* und darüber hinaus auch im Toc75-Homolog der freilebenden Rotalge *C. merolae* identifiziert werden. Zudem befindet sich 17 Aminosäuren hinter dem tripel-Glycin-Motiv im *P. tricornutum*-Protein ein A-X-A-Motiv, das eine putative Signalpeptidase I-Erkennungssequenz analog zu psToc75 darstellen könnte (siehe Abb. 5-5). Unter diesem Gesichtspunkt wurde im Folgenden untersucht, ob (i) ptOmp85 ein vergleichbares zwei-Schritt Importverhalten zeigt, und (ii) ob dieses ggf. durch das identifizierte tripel-Glycin-Motiv vermittelt wird. Hierfür wurden verschiedene Fusionsproteine konstruiert, bei denen unterschiedlich lange Abschnitte vom ptOmp85-N-Terminus an GFP fusioniert wurden. Dabei enthielten alle Konstrukte das Signalpeptid der BTS gefolgt von 10-100 nachfolgenden Aminosäuren. Entsprechende Konstrukte wurden in den Vektor pPha-NR kloniert, so dass sie in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle exprimiert werden konnten. Nach Transfektion und Analyse der Klone am KLSM zeigte sich, dass die Länge der vom ptOmp85-N-Terminus abgeleiteten Sequenz tatsächlich einen Effekt auf die Lokalisation des GFPs hatte. Sämtliche Konstrukte mit Signalpeptid plus 10, 20, 30, 50 (nicht gezeigt) und bis zu 60 anschließenden Aminosäuren wurden über alle vier Membranen ins Stroma transportiert, was sich an der kompletten Überlagerung von Chlorophyll- und GFP-Fluoreszenz zeigt (Abb. 5-6; ptOmp85-TP60-GFP). Erst wenn zusätzlich die zwei anschließenden Aminosäuren im Fusionskonstrukt enthalten waren (ptOmp85-TP62-GFP) änderte sich das Lokalisationsmuster hin zu einer „Blob“-ähnlichen Struktur, wie sie auch für das volle-Länge-ptOmp85-Protein beobachtet werden konnte.

TP10↓ TP20↓ TP30↓ TP40↓ TP50↓ TP60↓ ↓TP62 ↓TP75

MKTSSLVPLL LLALIVPECO A↓F LPPSNSPRG RIGGLFSQPF TDGRNSGDNG VPPSDDIGHL QAWDGFEGPT LLASIIRKND TDAPSGLRGG GDVVGQTQAT LSSTSSYWA~~K~~A↓F

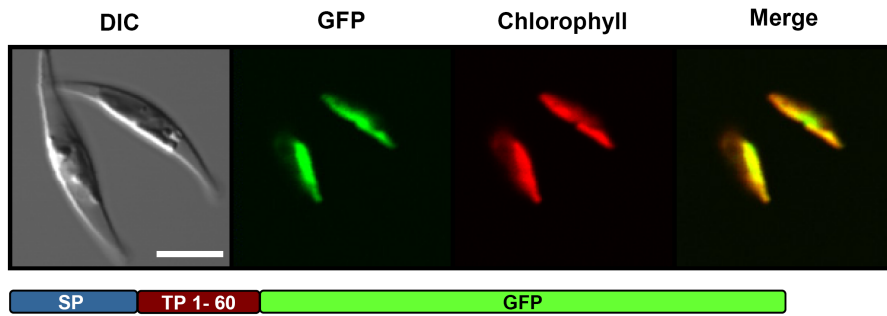
aa 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110

Abb. 5-5: Die 110 N-terminalen Aminosäuren von ptOmp85 mit markierten Sequenzmerkmalen

Unterhalb der Sequenz sind die fortlaufenden Aminosäurekoordinaten angegeben. Oberhalb wurden die Längen der Sequenzen für die verschiedenen GFP-Fusionskonstrukte markiert.

Das Signalpeptid in blau, das tripel-Glycin-Motiv ist unterstrichen, das postulierte A-X-A Signalpeptidase I-Motiv ist fett und unterstrichen.

ptOmp-TP60-GFP



ptOmp-TP62-GFP

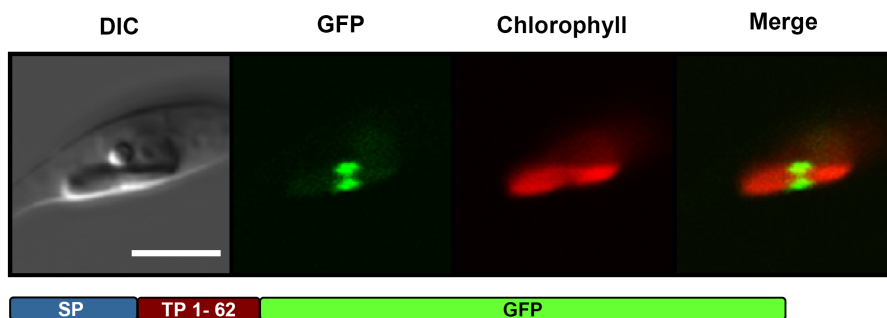


Abb. 5-6: ptOmp85 zeigt ein Zwei-Schritt Importverhalten

Die Länge des ptOmp85-N-Terminus beeinflusst die Lokalisation des fusionierten GFPs. Sequenzen, die dem ptOmp85-Signalpeptid plus bis zu 60 weiteren Aminosäuren entsprechen, dirigieren GFP vollständig ins Stroma der komplexen Plastide (ptOmp-TP60-GFP). Addition von nur zwei weiteren Aminosäuren (ptOmp-TP62-GFP) führt zu einer Veränderung der GFP-Lokalisation hin zu einer Destination außerhalb des Stromas. Diese entspricht der auch Lokalisation des volle-Länge Proteins. Maßstab = 5 µm.

Interessanterweise beinhaltet dieses Konstrukt jedoch nicht das tripel-Glycin-Motiv. Dieses folgt erst 10 Aminosäuren später. Eine anschließende erneute Analyse der ersten 100 Aminosäuren von ptOmp85 mittels eines Kyte-Doolittle-Hydrophathieplots (Kyte & Doolittle, 1982) offenbarte, dass genau im Bereich der Aminosäuren TP50-TP60 ein stark hydrophober Sequenzbereich liegt.

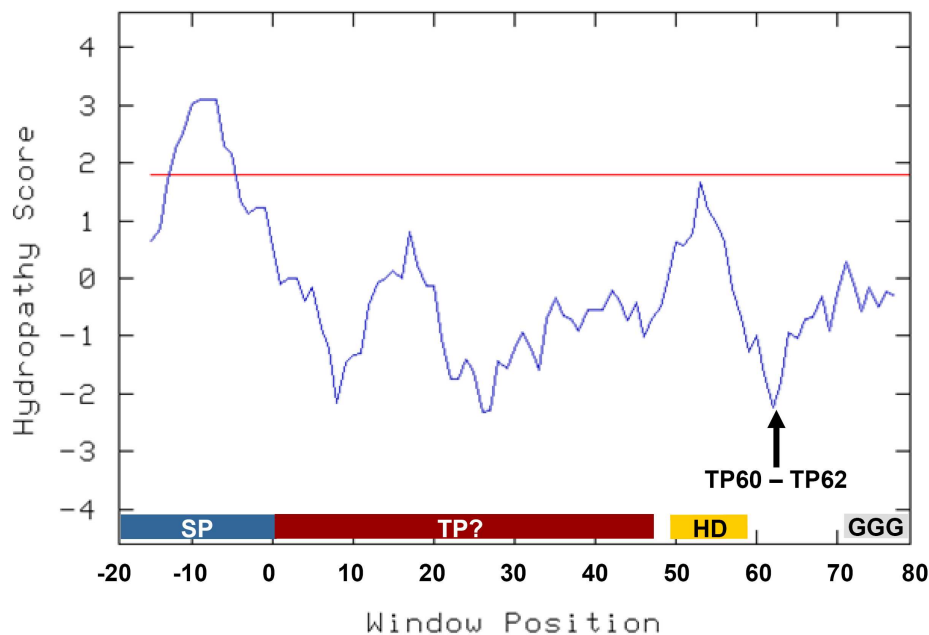


Abb. 5-7: Kyte-Doolittle-Hydropathie-Plot des ptOmp85-N-Terminus

Die Hydrophobizität der ersten 100 Aminosäuren von ptOmp85 wurde mittels Kyte-Doolittle Hydropathie-Plot analysiert (Fenstergröße = 9 Aminosäuren). Die Aminosäureposition wurde auf die +1-Position des Transitpeptides geeicht und die vorhergesagte BTS zur Orientierung als Schemazeichnung entlang der X-Achse mit aufgeführt. Die Aminosäureposition, an der die GFP-Fluoreszenz von stromal zu extra-stromal wechselt, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Unmittelbar vor diesem Transitionsunkt wird ein ca.10 Aminosäuren langer stark hydrophober Bereich (Hydrophobe Domäne; HD) identifiziert. Das tripele-Glycin-Motiv folgt erst 10 Aminosäuren hinter dem Transitionsunkt. Die tatsächliche Länge des Transitpeptides ist unklar, und kann hier nur geschätzt werden.

Neben diesem intraorganellären ptOmp85-Zielsteuerungssignal konnte im Genom von *P. tricornutum* außerdem ein putatives Homolog der plastidären Signalpeptidase 1 aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, das, analog zum Pflanzenprotein, die finale Prozessierung des ptOmp85-Vorläufers im Intermembranraum vermitteln könnte. Das *P. tricornutum*-Homolog besitzt jedenfalls eine vorhergesagte BTS für den plastidären Import am N-Terminus. Auch hier ist die +1-Position des Transitpeptides durch ein Phenylalanin besetzt, was für eine stromale Lokalisation sprechen würde. Eine Lokalisation dieses SP1-Homologs im Intermembranraum kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Es bleibt festzuhalten, dass in diesen GFP-Lokalisationsstudien mittels verschieden langer Sequenzabschnitte vom ptOmp85-N-Terminus ein zwei-Schritt-Importverhalten des Proteins nachgezeichnet werden konnte, bei dem allerdings das tripele-Glycin-Motiv keine oder keine ausschließliche Funktion zu haben scheint.

5.2.4 Das intraorganelläre Zielsteuerungssignal bewirkt heterolog die Relokalisierung stromaler Proteine

Um zu prüfen, ob der beobachtete zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus tatsächlich von dem identifizierten Sequenzbereich vermittelt wird, wurde der entsprechende Bereich aus ptOmp85 zwischen den Aminosäuren Leu71 – Thr98 (entspricht aa 50 – 77 des TP in Abb. 5-7) separat amplifiziert, und hinter die BTS des Fucoxanthin-Chlorophyll a-c-bindenden Proteins D (FcpD) kloniert. FcpD hat eine Funktion im Lichtsammelapparat des Photosystems, und wird daher natürlicherweise ins Stroma transportiert. Dementsprechend führte die Klonierung der FcpD-BTS an GFP zu einem stromalen Fluoreszenzmuster des GFP (nicht gezeigt). Eine Hybrid-Zielsteuerungssequenz aus der FcpD-BTS und dem beschriebenen Bereich aus ptOmp85 führte hingegen, genau wie bei ptOmp85 selbst, zu einer Relokalisierung von GFP zu einer Lokalisation außerhalb des Stromas (Abb. 5-8).

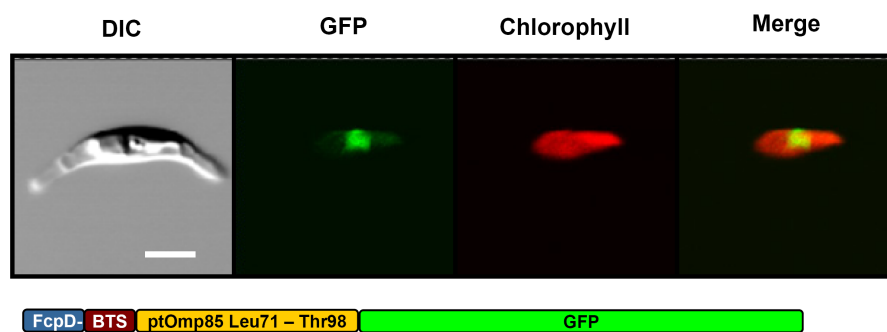


Abb. 5-8: Das intraorganelläre ptOmp85-Zielsteuerungssignal bewirkt heterolog die Relokalisierung von FcpD

Der Bereich aus dem ptOmp85 N-Terminus, der die Relokalisierung aus dem Stroma heraus bewirkt, wurde heterolog hinter die BTS von FcpD kloniert. Die Fusion dieses Konstrukts an GFP (FcpD-BTS – Omp-Leu71 – Thr98-GFP) bewirkt eine Lokalisierung ähnlich der von ptOmp-TP60-GFP. Maßstab = 5 µm.

5.2.5 Experimente mit dem *self-assembling split GFP*-System zur Klärung der ptOmp85-Topologie

Die bisherigen Beobachtungen zeigten, dass ptOmp85 verschiedene Charakteristika mit dem chloroplastidären Proteintranslokator Toc75 gemeinsam hat. Beide sind Mitglieder der Omp85-Familie, die man ausschließlich in den äußeren Membranen gram-negativer Bakterien und von diesen abstammenden intrazellulären Organellen findet. Sie besitzen eine ähnliche Tertiärstruktur und zeigen ein vergleichbares zwei-Schritt Importverhalten. Zusammen mit der beobachteten *in vivo*-Lokalisation und der nachgewiesenen Membraninsertion waren dies

starke Indizien, dass es sich bei der Zielmembran von ptOmp85 tatsächlich um die drittäußerste Membran der komplexen Plastide handelt.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde das sogenannte *self-assembling split GFP*-System (sasGFP) für *Phaeodactylum tricornutum* adaptiert. Das Grün Fluoreszierende Protein bildet in seiner nativen Konformation einen β -barrel, dessen Fassstruktur von elf β -Faltblättern gebildet wird. Beim sasGFP-System wird GFP in zwei unterschiedlich große Fragmente, S1-10 und S11, geteilt (Cabantous *et al.*, 2004), wobei das Fragment S1-10 den β -Faltblättern 1-10 und S11 dem β -Faltblatt 11 der Fassstruktur entspricht. Beide Fragmente sind für sich nicht in der Lage zu fluoreszieren. Werden sie jedoch gleichzeitig im gleichen zellulären Kompartiment exprimiert, können beide Fragmente unabhängig von ihren jeweiligen Fusionspartnern zum nativen β -barrel reassemblieren, und so die Fluoreszenzeigenschaften wiederherstellen.

5.2.5.1 Adaption des *self-assembling split GFP*-Systems für *Phaeodactylum tricornutum*

Um das System für *P. tricornutum* nutzbar zu machen, wurden beide Genfragmente mit geeigneten Schnittstellen modifiziert, um sie gemeinsam mit diversen Fusionspartnern in den Zielvektor pPha-Dual_{L/NR} oder pPha-Dual_{2xNR} klonieren zu können. pPha-Dual_{L/NR} besitzt zwei verschiedene Klonierungsstellen, eine unter der Kontrolle des Nitratreduktasepromotors, die andere unter der Kontrolle des Licht-induzierbaren FcpA-Promotors. Bei pPha-Dual_{2xNR} stehen beide Klonierungsstellen jeweils unter der Kontrolle des Nitratreduktasepromotors. Somit ist es möglich, zwei verschiedene Konstrukte gleichzeitig mit einem Plasmid in *P. tricornutum* einzubringen, und in Abhängigkeit von Licht und /oder der zugegebener Stickstoffquelle zu regulieren. Auf diese Weise wurden S1-10 und S11 als Fusionsproteine mit verschiedenen Fusionspartnern in unterschiedlichen Kombinationen in *P. tricornutum* transfiziert, um zunächst die Funktionalität des Systems und die Integrität der gewählten Markerproteine zu testen. Das heißt, Markerproteine für die unterschiedlichen subzellulären und subplastidären Kompartimente wurden zunächst dahingehend geprüft, ob sich ihre vorhergesagte Lokalisation mithilfe dieses Systems bestätigen lässt.

5.2.5.2 Das sasGFP-System ist in *P. tricornutum* funktionstüchtig.

Die Funktionalität des Systems wurde zunächst mit einem Licht-induzierbaren cytosolischen S1-10-Fragment und einem NO₃-induzierbaren Actin-S11 Fusionsprotein getestet. Zellen, die auf NH₄-haltigem Medium ausschließlich das S1-10-Fragment exprimierten, zeigten keine Fluoreszenz. Erst nach Überführen der Zellen in NO₃-haltiges Medium war eine deutliche cytosolische Fluoreszenz zu sehen (siehe Abb. 5-9). Das System war also offensichtlich in *P. tricornutum* funktionstüchtig.

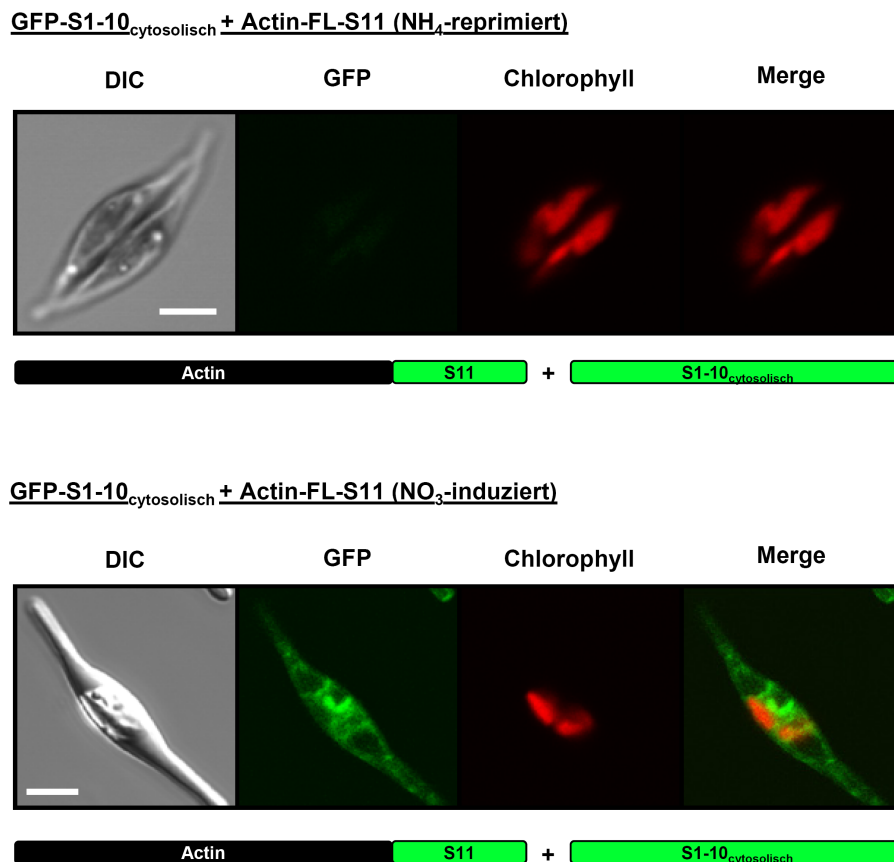


Abb. 5-9: Das self-assembling split GFP-System ist in *P. tricornutum* funktionstüchtig

An Actin fusioniertes GFP-S11 und cytosolisch lokalisiertes GFP-S1-10 wurden in *P. tricornutum* co-transfiziert. Zellen, die auf NH₄-haltigem Medium wuchsen, und daher nur S1-10 exprimierten, zeigten keine GFP-spezifische Fluoreszenz. Erst nach Induktion der Actin-S11-Expression auf NO₃-haltigem Medium konnte eine deutliche cytosolische GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Maßstab = 5 µm.

5.2.5.3 Auswahl und Prüfung verschiedener plastidärer Markerproteine

Im Weiteren wurden verschiedene plastidäre Markerproteine ausgewählt und getestet, von denen die subplastidäre Lokalisation bekannt war bzw. von denen die Lokalisation durch *in silico*-Vorhersagen und –Vergleiche angenommen werden konnte. Diese waren für die einzelnen subplastidären Kompartimente:

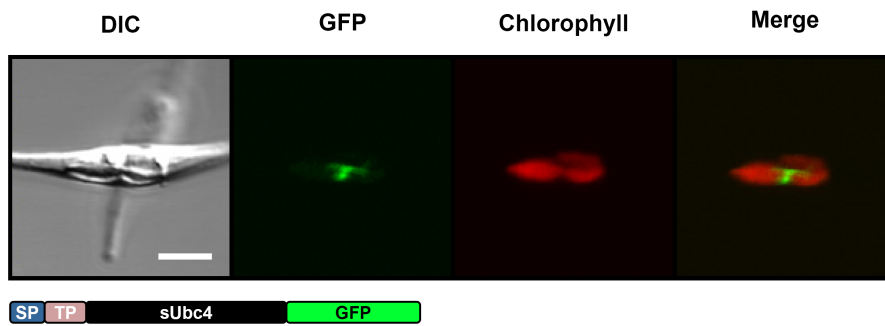
- das symbiontische Ubiquitin-konjugierende Enzym 4 (sUbc4) und das symbiontische Hitzeschockprotein 70 (sHsp70) für das PPC
- die ATP-Synthase-Untereinheit γ (AtpC) und das stromale Histon-ähnliche Protein (SHLP) für das Stroma.

Als Marker für den Intermembranraum wurden mittels BLAST-Suche ein *P. tricornutum*-Homolog der pflanzlichen Monogalactosyldiacylglycerol Synthase 1 (MGD1) ermittelt, da MGD1 durch biochemische Analysen im IMS von Chloroplasten nachgewiesen werden konnte (Vojta *et al.*, 2007).

Von sHsp70 und AtpC waren die Lokalisationen aus früheren Experimenten bekannt, die übrigen Proteine wurden zunächst in klassischen Lokalisationsstudien mittels GFP-Fusion analysiert. sUbc4 besitzt an der +1-Position ein Arginin, und sollte daher laut Vorhersage im PPC lokalisieren. Wie Abb. 5-10 zeigt, ergab die Fusion von sUbc4 an GFP tatsächlich eine „Blob“-ähnliche Struktur, wie man sie von PPC-lokalisierten Proteinen kennt (Gould *et al.*, 2006).

Klone, die ein MGD1-GFP Fusionsprotein exprimierten, zeigten eine deutliche Fluoreszenz in der Plastide, die jedoch eindeutig außerhalb des Stromas lokalisiert war. Die Fluoreszenz trat in der Form von „gepunkteten“ Strukturen auf, die um das Stroma herum akkumulierten (siehe Abb. 5-10 unten) Da MGD1 ein Phenylalanin an der +1-Position des Transitpeptides trägt, die Lokalisation aber eindeutig sowohl von „Blob“-ähnlichen Strukturen als auch ganz klar von stromalen Lokalisationen zu unterscheiden war, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine IMS-Lokalisation handelt.

sUbc4-FL-GFP



MGD1-FL-eGFP

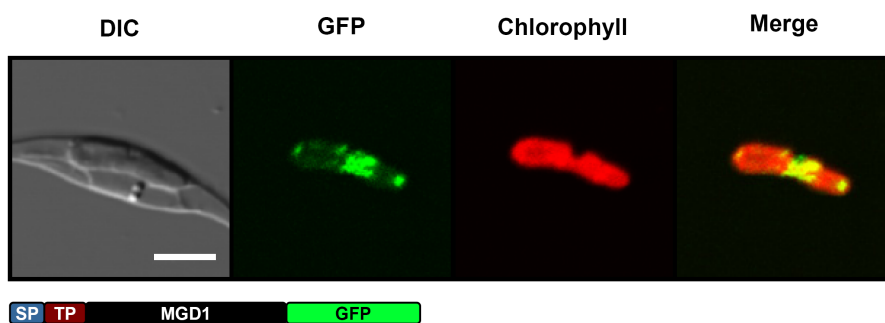


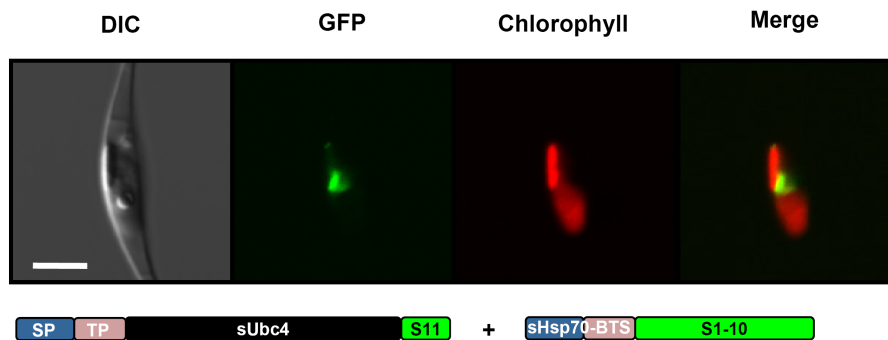
Abb. 5-10: *In vivo*-Lokalisation ausgewählter plastidärer Markerproteine

GFP-Fusionsproteine von volle-Länge sUbc4 und MGD1 wurden in *P. tricornutum* exprimiert. sUbc4-FL-GFP zeigt eine „Blob“-ähnliche Struktur, wie sie von PPC-residenten Proteinen bekannt ist. MGD1-FL-GFP offenbart eine gepunktete Fluoreszenz, die sowohl von bekannten „Blob“-ähnlichen Strukturen als auch ganz klar von stromalen Lokalisationen zu unterscheiden ist obwohl ein Phenylalanin an der +1-Position des MGD1-Transitpeptides zu finden ist. Maßstab = 5 µm.

Nachfolgend wurden verschiedene Markerproteine der einzelnen subplastidären Kompartimente mit den beiden GFP-Fragmenten S1-10 bzw. S11 fusioniert, und verschiedene Kombinationen dieser Konstrukte in *P. tricornutum* co-transfiziert. Hiermit konnte gezeigt werden, dass tatsächlich nur dann die Fluoreszenzeigenschaften des GFP wiederhergestellt werden konnten, wenn beide Fragmente, vermittelt durch ihre jeweiligen Fusionspartner, ins gleiche subplastidäre Kompartiment dirigiert wurden. Wurden beide Fragmente in unterschiedliche, durch eine oder mehrere Membranen getrennte, Kompartimente dirigiert, konnte keine GFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Abb. 5-11 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der co-Expression von sUbc4-FL-S11 mit sHsp70-BTS-S1-10 bzw. von sUbc4-FL-S11 mit AtpC-BTS-S1-10.

Die Ergebnisse sämtlicher Kontrollexperimente sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst.

sHsp70-BTS-S1-10 + sUbc4-FL-S11



AtpC-BTS-S1-10 + sUbc4-FL-S11

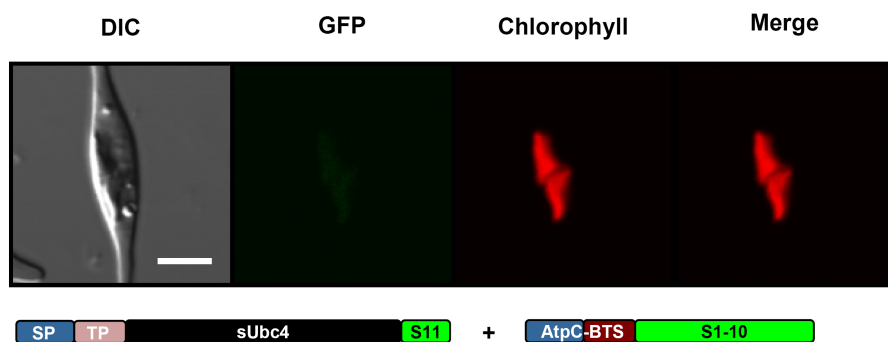


Abb. 5-11: Die sasGFP-Fluoreszenz lässt sich nur wiederherstellen, wenn beide Fragmente ins gleiche Kompartiment dirigiert werden.

Um die Integrität des gewählten Systems zu testen, wurden beide sasGFP-Fragmente durch Fusion an verschiedene Zielsteuerungssequenzen bzw. volle-Länge Proteine in verschiedene subplastidäre Kompartimente dirigiert. Wie hier am Beispiel zweier PPC-lokalisierter Fragmente (sHsp70-BTS-S1-10 + sUbc4-FL-S11) gezeigt, lässt sich die Fluoreszenz auch in der komplexen Plastide von *P. tricornutum* wiederherstellen. Sind beide Fragmente hingegen durch eine oder mehrere Membranen getrennt (hier: stromales AtpC-BTS-S1-10 + PPC-residentes sUbc4-FL-S11), lässt sich kein funktionstüchtiges GFP rekonstituieren; die Fluoreszenz bleibt aus. Maßstab = 5 µm.

Tabelle 5-2: Verschiedene Kombinationen von sasGFP Fusionskonstrukten

Aufgeführt sind die beiden jeweiligen Konstrukte im Vektor pPha-Dual_{L/NR} bzw. pPha-Dual_{2xNR} und das Ergebnis der co-Expression in *P. tricornutum*. Bei pPha-Dual_{L/NR} steht Konstrukt 1 unter Kontrolle des Licht-induzierbaren FcpD-Promotors und Konstrukt 2 unter Kontrolle des NO₃-induzierbaren Nitratreduktasepromotors.

Konstrukt 1	Konstrukt 2	Vektor	Fluoreszenz?	Lokalisation
S1-10 _{Cytosol}	Actin-FL-S11	pPha-Dual _{L/NR}	Ja	Cytosol
sUbc4-FL-S11	sHsp70-BTS-S1-10	pPha-Dual _{L/NR}	Ja	PPC ("Blob")
AtpC-BTS-S1-10	SHLP-FL-S11	pPha-Dual _{L/NR}	Ja	Stroma
sUbc4-FL-S11	AtpC-BTS-S1-10	pPha-Dual _{L/NR}	Nein	---
sUbc4-FL-S11	MGD1-FL-S1-10	pPha-Dual _{2xNR}	Nein	---

5.2.5.4 Das sasGFP-System offenbart eine IMS-Lokalisierung von ptSP1

Anschließend wurde das sasGFP-System verwendet, um die Lokalisation des identifizierten pl-SP1-Homologs aus *P. tricornutum*, ptSP1, genauer zu charakterisieren (Kap. 5.2.3). Vom pl-SP1-Protein aus Pflanzen ist bekannt, dass es intraplastidär dual lokalisiert ist (Shipman & Inoue, 2009). Ein Großteil der SP1-Proteine wird ins Thylakoidlumen importiert, wo sie die Prozessierung thylakoidaler Signalpeptide vermitteln (Chaal *et al.*, 1998). Ein Teil wird jedoch auch in den Intermembranraum transportiert (Shipman & Inoue, 2009), wo sie die Prozessierung des poly-Glycin-Motivs von Toc75 vermitteln (Inoue *et al.*, 2005).

Wie oben erwähnt, besitzt ptSP1 ein Phenylalanin an Position 1 des Transitpeptides. Tatsächlich zeigte sich bei *in vivo*-Lokalisationsstudien mit ptSP1-GFP-Fusionsproteinen lediglich eine schwache stromale Fluoreszenz (nicht gezeigt). Ein zum IMS-Markerprotein MGD1 vergleichbares Fluoreszenzmuster konnte nicht beobachtet werden. Bei der co-Transfektion von MGD1-S1-10 und ptSP1-S11 hingegen konnten GFP-Signale detektiert werden, deren Lokalisation klar der vom zuvor beobachteten Fusionskonstrukt MGD1-GFP entsprachen (Abb. 5-12). Hieraus ließ sich schließen, dass auch das pl-SP1 Homolog aus *P. tricornutum*, zumindest teilweise, in den Intermembranraum importiert wird.

Auch in der Lokalisierung der plastidären Signalpeptidase 1-Homologen scheint also die Situation in primären Chloroplasten und komplexen Plastiden vergleichbar zu sein. Gleichzeitig stand mit diesem Resultat neben MGD1 ein weiterer Intermembranraummarker für die anschließenden ptOmp85-Topologiestudien zur Verfügung.

MGD1-FL-S1-10 + SP1-FL-S11

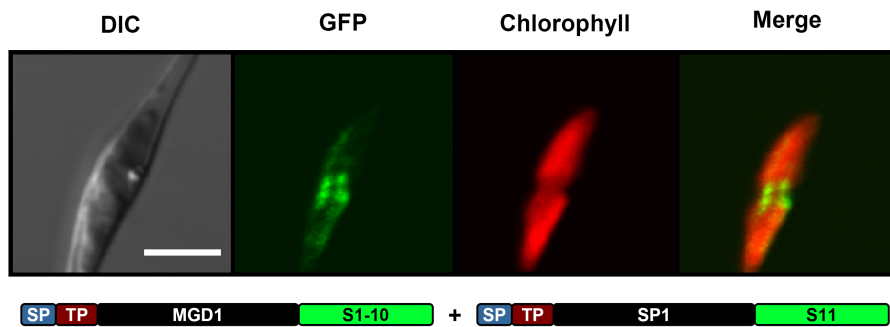


Abb. 5-12: Co-exprimiertes MGD1-FL-S1-10 und ptSP1-FL-S11 zeigen GFP-Fluoreszenz

Um die hypothetische IMS-Lokalisation des *P. tricornutum* pl-SP1-Homologs zu überprüfen, wurde das volle-Länge Protein mit GFP-S11 fusioniert und mit MGD1-FL-S1-10 co-exprimiert. Tatsächlich ließ sich hierdurch die GFP-Fluoreszenz wiederherstellen. Das Fluoreszenzmuster entsprach dabei dem von MGD1-FL-GFP (siehe Abb. 5-10). Maßstab = 5 µm.

5.2.5.5 Die ptOmp85-Termini weisen eine PPC-Orientierung auf

Da die Integrität des Systems mit den vorangegangenen Experimenten als gesichert betrachtet werden konnte, wurden im Folgenden die eigentlichen Experimente zur Klärung der Topologie mit ptOmp85-Fusionsproteinen durchgeführt. Hierfür wurde das S11-Genfragment so an den ptOmp85-Orf fusioniert, dass es entweder C- oder N-terminal ins reife, fertig prozessierte Protein eingebaut wurde. Für die C-terminale Fusion wurde einfach das endogene Stop-Codon von ptOmp85 eliminiert, und GFP-S11 im korrekten Leserahmen dahinter kloniert. Etwas schwieriger gestaltete sich die N-terminale Fusion, da der korrekte N-Terminus des fertig prozessierten Proteins nicht bekannt war. Analog zu psToc75 wurde aber davon ausgegangen, dass auch bei ptOmp85 eine finale Prozessierung des IMS-Zielsteuerungssignals erfolgte. Als putativer N-Terminus wurde daher Aminosäure Phe113 gewählt, da diese hinter der identifizierten hydrophoben Domäne im Bereich der Aminosäuren 71-81 und dem tripel-Glycin-Motiv (Aminosäuren 90-92), aber vor dem ersten POTRA-Motiv (Pro154) liegt. Vor allem aber liegt, wie unter 5.2.3 beschrieben, eine putative Signalpeptidase 1-Erkennungssequenz (A-X-A) unmittelbar vor dem gewählten Aminosäurerest Phe113 und ein entsprechendes pl-SP1-Homolog konnte im IMS der komplexen Plastide nachgewiesen werden (Kapitel 5.2.5.4).

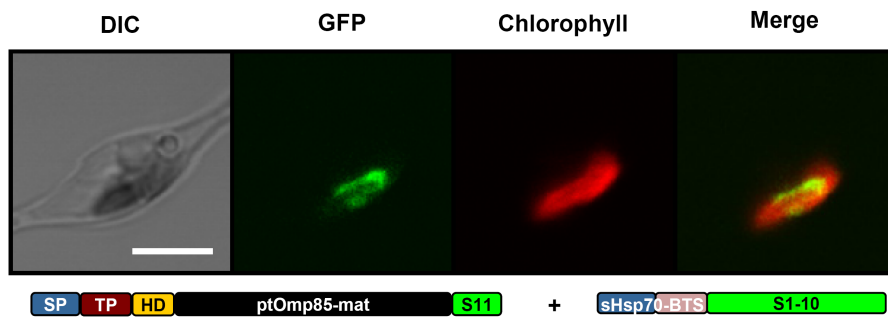
GFP-S11 wurde daher mittels geeigneter Restriktionsschnittstellen zwischen Aminosäure Phe113 und Gln114 kloniert. Das S11-Fragment, das im originären Zustand eine N-terminale Linkerregion (G-G-G-S-G-G-G-S) enthält, wurde dafür so umkonstruiert, dass die

Linkerregion nun C-terminal lag, und so als flexibler Platzhalter zwischen GFP-S11 und ptOmp85 fungieren konnte. Das endogene Stop-Codon von ptOmp85 blieb in diesem Konstrukt erhalten.

Aufgrund der Ungewissheit über den tatsächlichen N-Terminus des reifen ptOmp85-Proteins, wurde darüber hinaus auf die gleiche Weise ein zweites N-terminal fusioniertes GFP-S11-ptOmp85-Fusionsprotein generiert. Hierbei wurde S11 etwas weiter N-terminal direkt hinter das tripel-Glycin-Motiv zwischen die Aminosäuren Val95 und Lys96 kloniert.

Die derart modifizierten ptOmp85-Konstrukte wurden anschließend mit den erprobten Markerproteinen der verschiedenen subplastidären Kompartimente (fusioniert an GFP-S1-10) co-transfiziert, und entsprechende Klone am KLSM analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die GFP-Fluoreszenz ausschließlich dann wiederhergestellt werden konnte, wenn ptOmp-S11 zusammen mit einem PPC-lokalisierten GFP-S1-10 exprimiert wurde (Abb. 5-13 oben). Dies war zudem nicht nur bei der C-terminal markierten ptOmp85-Variante der Fall, sondern auch bei der ersten N-terminal fusionierten Variante (ptOmp85-S11 N-terminal Phe113; Abb. 5-14 oben). Bei der zweiten N-terminal fusionierten Variante (ptOmp85-S11 N-terminal Gln95) hingegen konnte keine Fluoreszenz wiederhergestellt werden (nicht gezeigt). Ebenso konnte keine GFP-spezifische Fluoreszenz detektiert werden, wenn GFP-S1-10 ins Stroma oder in den Intermembranraum der Plastide dirigiert wurde (Abb. 5-13/5-14 unten). Tabelle 5-3 fasst die Ergebnisse sämtlicher co-Transfektionsexperimente zusammen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sowohl N- als auch C-Terminus des reifen ptOmp85 im periplastidären Kompartiment lokalisiert sind.

sHsp70-BTS-S1-10 + Omp-FL-S11 (C-term)



MGD1-S1-10 + Omp-FL-S11 (C-term)

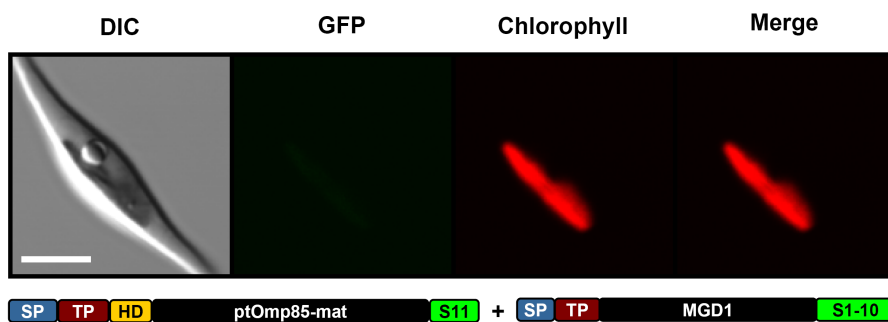
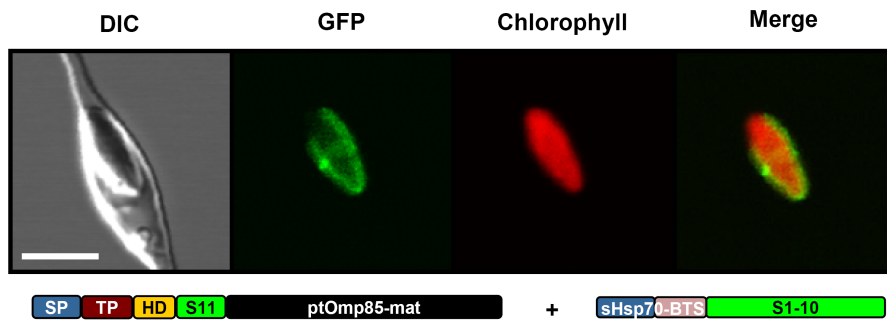


Abb. 5-13: ptOmp85-FL-S11 und PPC-lokalisiertes S1-10 zeigen Fluoreszenz

Um die Lokalisation der Termini von ptOmp85 zu bestimmen, wurde S11 C-terminal an das volle-Länge Protein fusioniert, und mit verschiedenen lokalisierten GFP-S1-10 co-exprimiert. Fluoreszenz konnte ausschließlich wiederhergestellt werden, wenn S1-10 mittels der sHsp70-BTS ins PPC dirigiert wurde (oben), nicht aber mit einem IMS-lokalisierten MGD1-S1-10 (unten). Maßstab = 5 µm.

sHsp70-BTS-S1-10 + Omp-FL-S11 (N-term)



SP1-S1-10 + Omp-FL-S11 (N-term)

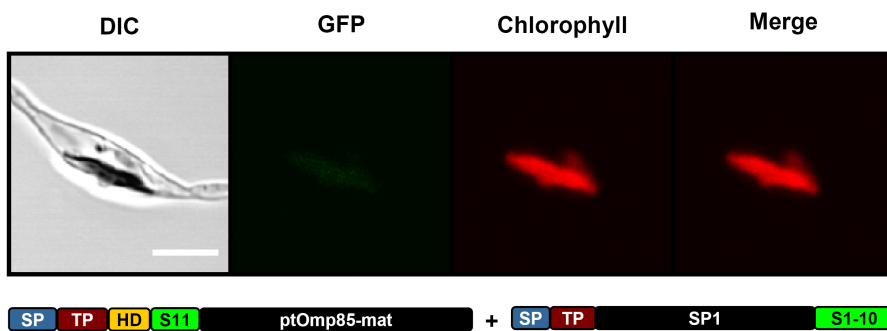


Abb. 5-14: N-terminal fusioniertes ptOmp85-S11 zeigt das gleiche Fluoreszenzverhalten wie die C-terminal fusionierte Variante.

Die gleichen Versuche wie in Abb. 5-13 wurden mit N-terminal fusioniertem ptOmp85-S11 durchgeführt. S11 wurde dafür an den vermuteten N-Terminus des reifen ptOmp85-Proteins kloniert, also hinter die putative SP1-Erkennungssequenz zwischen der hydrophoben Domäne (HD) und dem ersten POTRA-Motiv. Hierbei wurden die gleichen Ergebnisse erzielt, wie beim C-terminal fusionierten ptOmp85-S11: Fluoreszenz ließ sich ausschließlich mit PPC-lokalisiertem S1-10 wiederherstellen (oben). Als negativ-Kontrolle wurde in diesem Fall das IMS-lokalisierte pl-SP1-Homolog mit S1-10 fusioniert und co-transfiziert, wobei keine Fluoreszenz wiederhergestellt wurde (unten). Maßstab = 5 µm.

Tabelle 5-3: Zusammenfassung sämtlicher Ergebnisse der sasGFP-Experimente mit ptOmp85-Fusionskonstrukten

Konstrukt 1	Konstrukt 2	Vektor	Fluoreszenz?	Lokalisation
ptOmp85-FL-S11 (C-terminal)	sHsp70-BTS-S1-10	pPha-Dual _{2xNR}	Ja	PPC/ dritte Plastidenmembran
sHsp70-BTS-S1-10	ptOmp85-FL-S11 (N-terminal; Phe113)	pPha-Dual _{LNR}	Ja	PPC/ dritte Plastidenmembran
ptOmp85-FL-S11 (C-terminal)	AtpC-BTS-S1-10	pPha-Dual _{2xNR}	Nein	---
ptOmp85-FL-S11 (C-terminal)	ptSP1-FL-S1-10	pPha-Dual _{2xNR}	Nein	---
SP1-FL-S1-10	ptOmp85-FL-S11 (N-terminal; Phe113)	pPha-Dual _{LNR}	Nein	---
ptOmp85-FL-S11 (C-terminal)	MGDG1-FL-S1-10	pPha-Dual _{2xNR}	Nein	---
sHsp70-BTS-S1-10	ptOmp85-FL-S11 (N-terminal; Val95)	pPha-Dual _{LNR}	Nein	---

5.3 Elektrophysiologische Analysen

5.3.1 ptOmp85 bildet eine Pore in artifiziellen Biomembranen mit vergleichbaren Eigenschaften wie Toc75

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die C-terminale Hälfte ptOmp85, zumindest im ComputermodeLL, deutlich die Struktur eines 16-strängigen β -barrels einnimmt, und das ptOmp85 tatsächlich ein integrales Protein der drittäußersten Plastidenmembran von *P. tricornutum* ist. Unklar war hingegen, ob der vorhergesagte β -barrel auch imstande ist, eine Pore in der Membran zu bilden, durch die Proteine transportiert werden könnten.

Um dies zu klären wurde ptOmp85 mit einem N-terminalen Hexa-Histidin- (6His)-Tag fusioniert und heterolog in *E. coli* überexprimiert. Das Überexpressionsprodukt wurde unter denaturierenden Bedingungen in zwei chromatographischen Schritten zunächst mittels des 6His-Tags über eine Ni-NTA-Agarose-Säule und anschließend im Ionenaustauschverfahren über eine MonoS-Säule aufgereinigt (siehe Abb. 5-15 / 5-16).

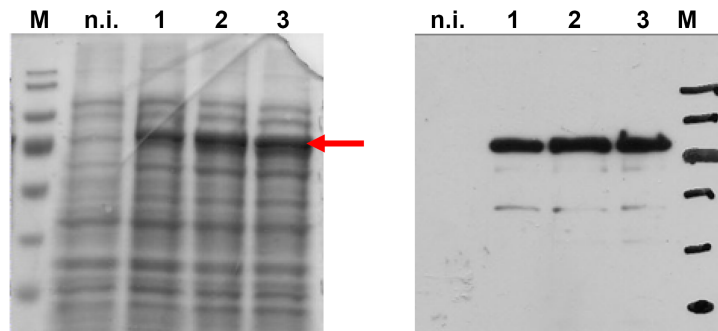


Abb. 5-15: Heterologe Überexpression von ptOmp85

ptOmp85 wurde in pQE30 kloniert, in *E. coli* BL21-Zellen transformiert, und in Abhängigkeit von IPTG im Medium mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-Tag exprimiert. Im Coomassie-gefärbten Gel (links) sieht man nach 1, 2 und 3 Stunden Inkubation in LB + 1 mM IPTG eine deutlich zunehmende Proteinbande bei ~75 kDa, die in der nicht induzierten Kultur (n.i.) fehlt.

Eine Western Blot-Analyse des Gels mit einem anti-6His Antikörper (rechts) bestätigt, dass es sich bei dieser Bande um das gewünschte Fusionsprotein handelt. (M = Molekulargewichtsmarker)

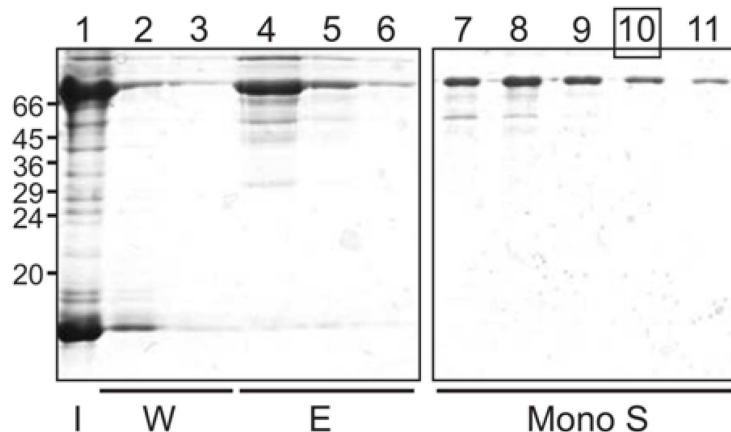


Abb. 5-16: Chromatographische Aufreinigung von 6His- ptOmp85

Heterolog exprimiertes 6His-ptOmp85 wurde in zwei chromatographischen Verfahren aufgereinigt, und Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte in Coomassie-gefärbten Gelen analysiert. Zunächst erfolgte eine erste Aufreinigung mittels des 6His-Tags über eine Ni-NTA-Säule. Aufgetragen wurden Proben vom eingesetzten Lysat (1), den beiden Waschschritten (2-3) und den drei Eluaten (4-6).

Die Eluate 4 und 5 wurden vereint, und weiter mittels Ionenaustauschchromatographie über eine MonoS-Säule aufgereinigt. Eluierte Proteine wurden in mehreren Fraktionen gesammelt. Fraktion 10 zeigte das beste Verhältnis von Ausbeute zu bestmöglicher Reinheit, und wurde für die weiteren Rekonstitutionen verwendet.

Das derart aufgereinigte Protein wurde gemäß Kapitel 4.4.9 in Proteoliposomen inkorporiert. Diese wurden in die Messkammer eines Elektrophysiologie-Messstandes eingebracht, deren zwei Hälften durch eine artifizielle Biomembran getrennt waren. Die Lipidkomposition der Membran orientierte sich dabei an der Zusammensetzung der äußeren Chloroplastenmembran von Pflanzen. Die Fusion der Proteoliposomen mit der Biomembran wurde durch Zugabe von

Ca^{2+} -Ionen induziert, und ptOmp85 somit in die Membran integriert. Die Bedingungen wurden dabei so angepasst, dass immer nur ein einzelnes Protein je Messversuch integrierte. Von diesem wurden dann die elektrophysiologischen Eigenschaften unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und variablen Kommandospannungen, gemessen.

Zunächst wurde das Umkehrpotential (U_{rev}) des Proteins bestimmt. Hierfür wurden beide Halbkammern mit Puffern unterschiedlicher KCl-Konzentration gefüllt (*cis/trans* = 250 mM/20 mM KCl), und die angelegte Kommandospannung U_{com} in einer Spannungsrampe von -50 mV mit einer Rate von 10 mV/s bis auf ein Endpotential von +100 mV angehoben. Auf diese Weise konnte ein Umkehrpotential von $U_{\text{rev}} \approx 38$ mV bestimmt werden. Gemäß der Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung (Formel 2; Kapitel 4.5.1.2) (Hille, 2001) lässt sich aus den bekannten Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran und dem ermittelten Umkehrpotential das Permeabilitätsverhältnis der jeweiligen Ionen und somit ggf. eine bestimmte Ionenselektivität der Pore bestimmen. Aus dem Umkehrpotential von 38 mV von ptOmp85 ergab sich nach Formel 2 ein Permeabilitätsverhältnis von $P_{\text{K}^+} : P_{\text{Cl}^-} = 6,9:1$. Dies bedeutet, dass die ptOmp85-Pore eine Kationenselektivität besitzt

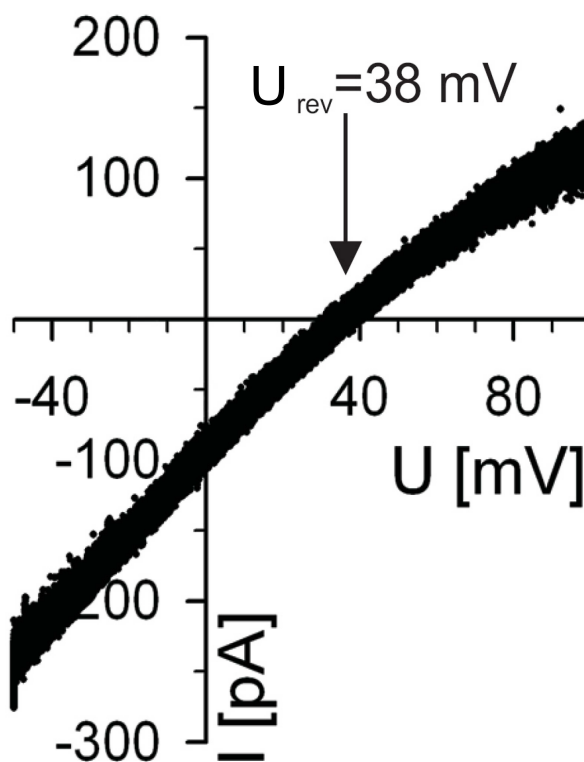


Abb. 5-17: Das Umkehrpotential von ptOmp85

Die durch ptOmp85 fließende Stromstärke wurde unter asymmetrischen Bedingungen (*cis/trans* 250 mM/20 mM KCl) in einer Spannungsrampe von -50 - +100 mV gemessen. Das Umkehrpotential U_{rev} , also der Punkt, an dem kein Netto-Stromfluss zu messen ist, konnte auf ≈ 38 mV bestimmt werden.

Weiterhin wurde das Schaltverhalten von rekonstituierten ptOmp85 unter symmetrischen Bedingungen (*cis/trans* = 250 mM/250 mM KCl) bei einer konstanten Kommandospannung $U_{\text{com}} = 100 \text{ mV}$ analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ptOmp85 tatsächlich ein von U_{com} abhängiges Schaltverhalten zeigte, wobei zwei verschiedene offene Zustände des Proteins, die Leitzustände $g_{\text{GROß}}$ und g_{KLEIN} , registriert werden konnten.

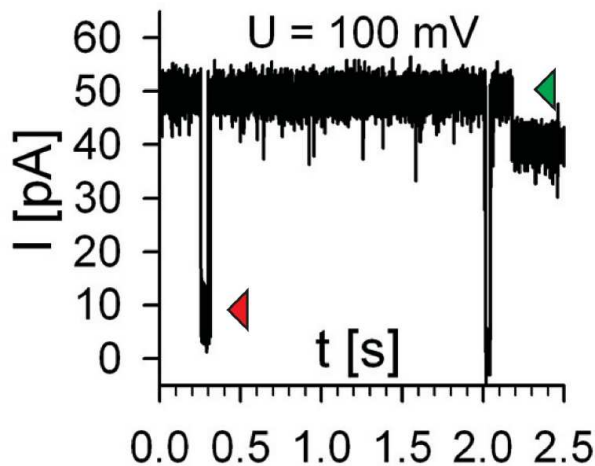


Abb. 5-18: ptOmp85 zeigt verschiedene Schaltvorgänge

Unter symmetrischen Bedingungen (*cis/trans* 250 mM/250 mM KCl) konnten bei einer konstanten Kommandospannung von 100 mV verschiedene Schaltvorgänge registriert werden. Hauptsächlich traten dabei zwei Leitzustände auf, $g_{\text{GROß}}$ (roter Pfeil) und g_{KLEIN} (grüner Pfeil) genannt.

Die hierbei gemessenen Stromstärken der beiden Amplituden sind direkt proportional zur angelegten Kommandospannung. Bei Messungen mit einer Schrittweise veränderten Kommandospannung von -100 mV auf +100 mV wurden daher die resultierenden Stromstärkendifferenzen ΔI von $g_{\text{GROß}}$ und g_{KLEIN} aufgezeichnet, und in einem Strom-Spannungs-Diagramm aufgetragen. Gemäß dem Ohm'schen Gesetz können nach Formel 3, Kapitel 4.5.1.3, aus der Steigung der linearen Regression der Messpunkte die Leitwerte der jeweiligen offenen Zustände des Kanalproteins kalkuliert werden. Diese betrugen für $g_{\text{GROß}} = 467 \pm 8 \text{ pS}$ und für $g_{\text{KLEIN}} = 90 \pm 6 \text{ pS}$.

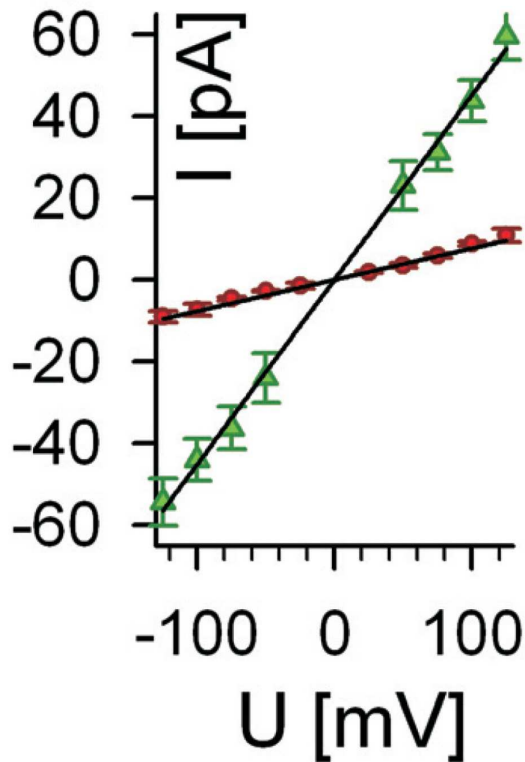


Abb. 5-19: Stromstärke-Spannungs-Abhängigkeit von $g_{\text{GROß}}$ und g_{KLEIN}

Die Größe der Amplitude der Stromstärke von $g_{\text{GROß}}$ (grüne Dreiecke) und g_{KLEIN} (rote Kreise) wurde in Abhängigkeit der angelegten Kommandospannung unter symmetrischen Bedingungen (*cis/trans* 250 mM/250 mM KCl) bestimmt, und in einem Stromstärke-Spannungs-Diagramm aufgetragen. Aus den Steigungen der resultierenden Geraden ließen sich die Leitwerte der beiden Zustände mit $g_{\text{GROß}} = 467 \pm 8$ pS und für $g_{\text{KLEIN}} = 90 \pm 6$ pS errechnen.

Der Leitwert einer Pore wiederum ist ein indirektes Maß für dessen Durchmesser, der mithilfe von Formel 4, Kapitel 4.5.1.4, errechnet werden kann. Für den Hauptleitwert $g_{\text{GROß}}$ ergibt sich hierbei ein errechneter Durchmesser von $d \approx 1,5$ nm.

6 Diskussion

Die Identifizierung eines Proteins mit putativer Omp85-Signatur im Genom von *P. tricornutum* durch Wunder und Kollegen (Wunder *et al.*, 2007) offerierte erstmals einen vielversprechenden Kandidaten für das lang gesuchte Translokton der drittäußeren Membran der komplexen Plastide von Chromalveolaten. Das entsprechende Protein, hier ptOmp85 genannt, konnte im Zuge dieser Arbeit eingehend charakterisiert werden.

6.1 Die *in silico* Analyse von ptOmp85 bestätigt die Zugehörigkeit zur Omp85-Familie und impliziert die Verwandtschaft zu Toc75-Proteinen

Durch initiale computergestützte Analysen konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die Aminosäuresequenz von ptOmp85 tatsächlich in die Struktur eines Omp85-Proteins falten lässt. Das generierte dreidimensionale Homologiemodell offenbarte eine klare β -barrel-Struktur in der C-terminalen Hälfte, die, wie es für Omp85-Proteine typisch ist, aus 16 antiparallel angeordneten β -Faltblättern aufgebaut ist (Gentle *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnten am N-Terminus zwei distinkte POTRA-Motive, die eigentlich definierenden Elemente von Omp85-Proteinen, zwischen der vorhergesagten BTS und der β -barrel-Domäne identifiziert werden. Dies zeigt, dass ptOmp85 tatsächlich als Mitglied der Omp85-Familie zu klassifizieren ist. Auffällig ist allerdings ein ca. 50 aa langer Abschnitt der zwischen β -Faltblatt 1 und α -Helix 1 innerhalb von POTRA-Motiv 2 liegt. Ein solch ungewöhnlicher Abschnitt, der das Motiv quasi unterbricht, konnte in dieser Form bisher nicht beobachtet werden, weshalb er auch im Homologiemodell nicht strukturell modelliert werden konnte. Dies wirft die Frage auf, ob diesem Abschnitt eine funktionelle Bedeutung zukommt, und welche dies sein könnte. Denkbar wären hier zum Beispiel eine Funktion als flexibler Linker zwischen beiden POTRA-Motiven, oder eine regulierende Wirkung auf den Zustand der β -barrel-Pore.

Da inzwischen mehrere Genome von Chromalveolaten vollständig sequenziert sind, konnten diese mittels BLAST-Suche mit ptOmp85 als Matrize nach weiteren Homologen durchsucht werden. Tatsächlich konnten sowohl im Genom der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* als auch in den Genomen der Haptophyte *Emiliania huxleyi* und der Apicomplexen *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* entsprechende Homologe identifiziert werden. Deren Analyse ergab, soweit möglich, dass auch diese Homologen voraussichtlich in den komplexen Plastiden der jeweiligen Organismen lokalisiert sind. Einschränkend muss hierbei erwähnt

werden, dass für *T. gondii* kein entsprechender Algorithmus für die Vorhersage von apicoplastidären Zielsteuerungssequenzen existiert. Gleichwohl aber findet sich hier am N-Terminus ein deutliches Signalpeptid, was die Existenz einer vollständigen BTS wahrscheinlich erscheinen lässt. Beim Homolog aus *E. huxleyi* konnten zwar die notwendigen Motive einer POTRA-Domäne und einer β -barrel-Domäne identifiziert werden, der tatsächliche N-Terminus des Proteins ließ sich hingegen nicht ermitteln. Erschwert wurde dies durch die bisher unvollständige Assemblierung des *E. huxleyi*-Genoms, denn in den bislang annotierten Sequenzgerüsten finden sich gleich zwei zu ptOmp85homologe Sequenzen. Diese besitzen eine nahezu identische Kernregion, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren 5' und 3'-terminalen Bereichen. Es ist unklar, ob es sich hierbei um einen Fehler in der Genomassemblierung handelt, oder ob tatsächlich beide Kopien in dieser Form existieren, und, wenn ja, ob beide Kopien funktionell exprimiert werden. Eine putative BTS findet sich bei keiner der beiden Kopien, allerdings existieren zu beiden Modellen auch keine EST-Daten, so dass das korrekte 5'-Ende unbekannt ist.

Nichts desto trotz war auch die *E. huxleyi*-Sequenz ausreichend, um sie zusammen mit den anderen Chromalveolaten-Omp85-Homologen und weiteren Vertretern der Proteinfamilie phylogenetisch zu analysieren. Wie Abb. 5-2 zeigt, lässt sich hierbei eine klare Trennung von mitochondriellen und proteobakteriellen Omp85-Proteinen auf der einen, und cyanobakteriellen und plastidären Omp85-Proteinen auf der anderen Seite erkennen. Eine derartige Aufspaltung von unterschiedlichen Vertretern der Omp85-Familie ist bekannt, und bestätigt daher noch einmal die zuvor beobachtete Gruppierung in Toc75-artige und Sam50-artige Omp85-Proteine (Bredemeier *et al.*, 2007). Die hier identifizierten Omp85-Homologen der verschiedenen Chromalveolaten bilden eine gemeinsame Klade innerhalb des Toc75-Astes des Stammbaums. Die nächste Verwandtschaftsbeziehung zeigt diese Klade zum Toc75-Homolog der freilebenden Rotalge *C. merolae*. Dieser Befund deutet zum einen darauf hin, dass ptOmp85 und seine Homologen tatsächlich vom Toc75-Typus, und nicht vom Sam50-Typus sind, und, dass diese Homologen einen Rhodophyten-Ursprung besitzen. Dass sie innerhalb des Stammbaums eine gemeinsame Klade bilden, kann zudem als weiteres Indiz gedeutet werden, dass zumindest die Endosymbionten der Chromalveolaten, einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen (Cavalier-Smith, 1999). Als Hinweis auf einen monophyletischen Ursprung der Chromalveolaten insgesamt hingegen lässt sich dieses Ergebnis nicht zwingend deuten. Denn auch mit dem von Sanchez-Puerta und Delwiche vorgeschlagene Chromalveolaten-Evolutionsmodell der seriellen tertiären Endosymbiose können diese gemeinsamen Verwandtschaftsbeziehungen hinreichend erklärt werden.

6.2 ptOmp85 ist ein integrales Protein der dritttäuersten Plastidenmembran

Nachdem diese bioinformatischen Befunde ein klarer Hinweis auf eine Toc75-artige Natur von ptOmp85 waren, wurde das Protein im Weiteren eingehender *in vivo* und *in vitro* analysiert.

Initiale *in vivo*-Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionsproteinen zeigten, dass der N-Terminus von ptOmp85 tatsächlich eine funktionelle BTS darstellt, die den Import des Proteins in die komplexe Plastide vermittelt. Die subplastidäre Fluoreszenz zeigte indes genau eine solche Lokalisation, wie man sie für ein Protein erwarten würde, das in eine der umgebenden Plastidenmembranen integriert wird. Sie akkumulierte innerhalb der Plastide in einem schmalen Band, dass das Stroma umgibt.

Nachfolgend durchgeführte Studien zur Membranintegration von ptOmp85 zeigten eindeutig, dass das volle-Länge Protein ausschließlich in der Membranfraktion von *P. tricornutum* nachgewiesen werden kann. Die Integrität der hergestellten Proteinfractionen wurde dabei mit einem anti-PsbO Antikörper geprüft. Da hier ausschließlich Signale in der löslichen Fraktion auftraten, kann von einer korrekten Fraktionierung ausgegangen werden. Gleichzeitig wurden auf die gleiche Weise Klone untersucht, die ein Fusionsprotein aus GFP und der ptOmp85-BTS exprimierten, um zu testen, ob die beobachtete Membraninsertion ein spezifisches, durch die GFP-Fusion bedingtes Artefakt darstellt. Die Lokalisation beider Konstrukte war ähnlich, jedoch ließ sich das GFP, das ausschließlich die BTS von ptOmp85 trug, nur in der löslichen und nicht in der Membranfraktion nachweisen. Das bedeutet, dass die beobachtete Membraninsertion auf das volle-Länge ptOmp85-Protein zurückgehen muss. Zusammen mit der beobachteten Lokalisation lässt dies einzig den Schluss zu, dass ptOmp85 tatsächlich, wie vorhergesagt, integraler Bestandteil einer der drei inneren Plastidenmembranen ist (die Insertion in die äußerste Membran führt bekanntermaßen zu einer ER-ähnlichen Lokalisation (Hempel *et al.*, 2009)).

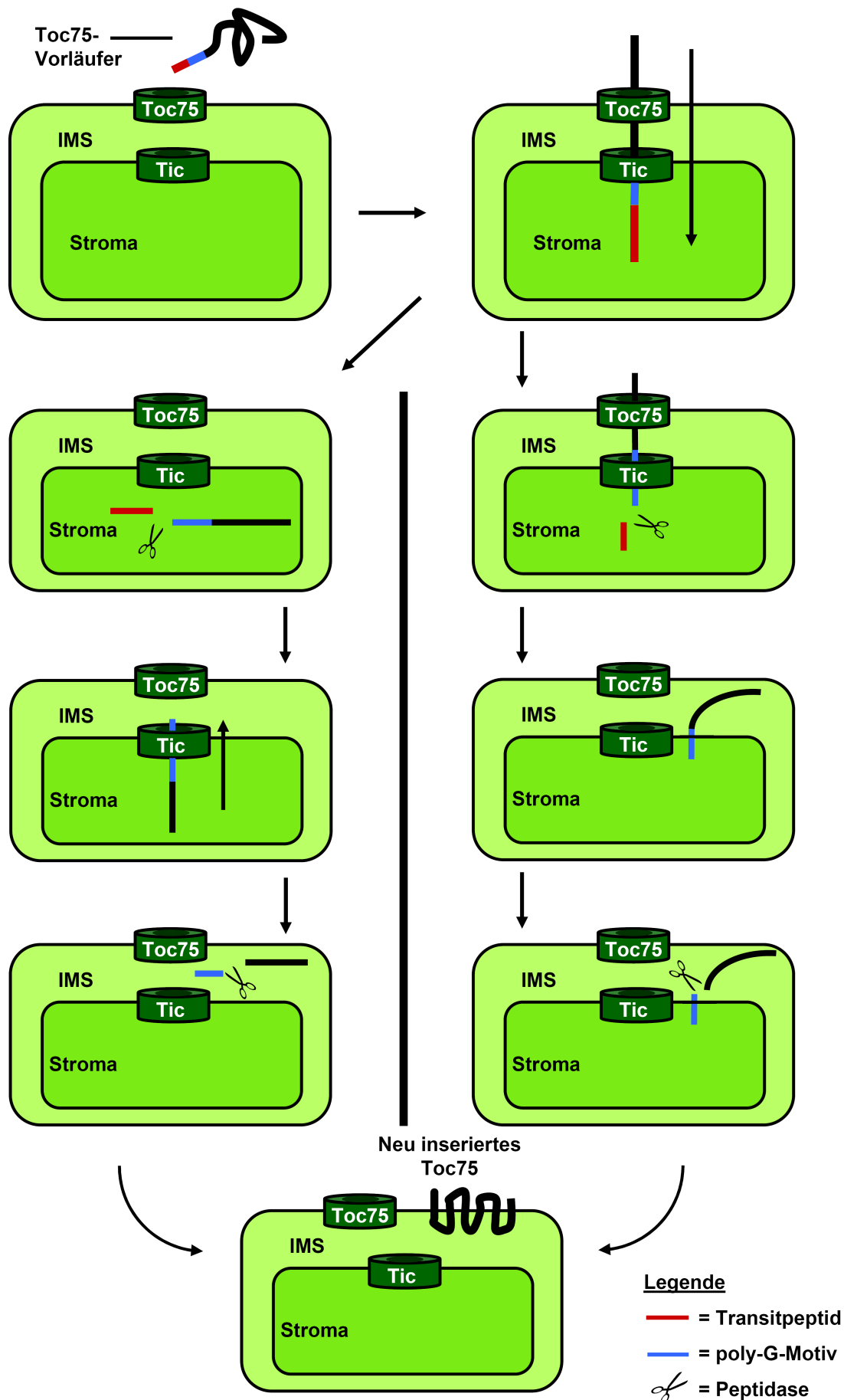
Gleichwohl gab die beobachtete Lokalisation auf den ersten Blick Rätsel auf, da sich an der ersten Position des ptOmp85-Transitpeptides ein Phenylalanin findet, dass in *P. tricornutum* als Signal für den Import über alle vier Plastidenmembranen ins Stroma dient. Mittels verschiedenen langer Sequenzen vom ptOmp85 N-Terminus konnte in GFP-Lokalisationsexperimenten gezeigt werden, dass der Importmechanismus des Proteins komplexer ist als anfangs vermutet, und von zusätzlichen Zielsteuerungselementen abhängt. Es stellte sich heraus, dass das ptOmp85-Signalpeptid plus der direkt anschließenden 10, 20, 30, 50 und 60 Aminosäuren GFP vollständig in das Stroma der Plastide dirigierte, genau wie es das Phenylalanin an der +1-Position vermuten lassen würde. Addition von nur zwei

weiteren Aminosäuren hingegen führte zu der extra-stromalen Lokalisation, wie sie auch für das volle-Länge Protein beobachtet wurde. Offensichtlich musste also in diesem Bereich des N-Terminus ein weiteres zielsteuerndes Element enthalten sein, dass diese veränderte Lokalisation verursachte.

Interessanterweise kennt man einen ähnlich komplexen Zielsteuerungsmechanismus auch aus biochemischen Analysen von Toc75 aus *Pisum sativum*. Hier konnte durch *in vitro* Importstudien mit radioaktiv markiertem psToc75 und isolierten Chloroplasten gezeigt werden, dass Toc75 sein Ziel, die äußere Chloroplastenmembran, in zwei Schritten erreicht, die von zwei distinkten Zielsteuerungssequenzen gesteuert werden (Tranel & Keegstra, 1996). Ein N-terminales Transitpeptid vermittelt dabei zunächst den Import von Toc75 ins Stroma des Chloroplasten. Es ist dabei jedoch bisher unbekannt, ob der Toc75-Vorläufer vollständig oder nur partiell ins Stroma transportiert wird. Das Transitpeptid wird auf jeden Fall im Stroma durch die Aktivität der stromalen Prozessierungspeptidase abgespalten (Tranel & Keegstra, 1996). Hinter dem Transitpeptid liegt das zweite Zielsteuerungselement, ein poly-Glycin-Motiv der Sequenz G-G-G-A-G-G-G-G-G-G. Dieses bewirkt auf bisher nicht geklärte Weise die Relokalisierung von Toc75 in den Intermembranraum (Inoue & Keegstra, 2003). Über den zugrunde liegenden *Modus operandi* existieren zwei verschiedene Modellvorstellungen. Gemäß dem ersten Modell wird psToc75 zunächst vollständig ins Stroma importiert. Das poly-Glycin-Motiv fungiert dann als Reexportsignal ähnlich einem bakteriellen Signalpeptid. Gemäß Modell 2 wird psToc75 nur partiell ins Stroma importiert, wo das Transitpeptid abgespalten wird. Das poly-Glycin-Motiv fungiert hier demnach als Stop-Transfer-Sequenz, die eine weitere Translokation über die innere Chloroplastenmembran verhindert. Abb. 6-1 fasst diese beiden Modelle schematisch zusammen.

Abb. 6-1 (Seite 76): Zwei Modelle des Zwei-Schritt Importmechanismus von psToc75

psToc75 besitzt zwei distinkte Zielsteuerungssequenzen am N-Terminus, eine Transitpeptid (rot) und ein nachfolgendes poly-Glycin Motiv. Bisher ist unklar, ob das Transitpeptid Toc75, vollständig oder nur partiell ins Stroma dirigiert. Entsprechend funktioniert das poly-Glycin Motiv nach der Prozessierung des Transitpeptides als Reexportsignal (links) oder als Stop-Transfer-Sequenz, die einen weiteren Transport über die innere Membran verhindert (rechts). In beiden Fällen wird die zweite Zielsteuerungssequenz im IMS abgespalten, und Toc75 in die äußere Chloroplastenmembran integriert.



Im Unterschied zu Toc75 findet man allerdings weder bei ptOmp85 noch dessen Homologen in Chromalveolaten ein vergleichbares poly-Glycin-Motiv, und auch dem Toc75-Homolog der freilebenden Rotalge *C. merolae* (cmToc75) fehlt ein solches. In ptOmp85 und dessen Homolog aus *T. pseudonana* sowie in cmToc75 findet sich lediglich ein tripel-Glycin-Motiv zwischen dem identifizierten Transitpeptid und dem ersten POTRA-Motiv. Dennoch erschien dieser Befund zunächst auffällig, da Baldwin und Inoue 2006 zeigen konnten, dass für die effiziente Zielsteuerung von Toc75 in den Intermembranraum lediglich die letzten drei Glycine des poly-Glycin-Motivs ausschlaggebend sind. Baldwin und Inoue hatten die 9 Glycine des Toc75-Motivs in drei Triplets eingeteilt und seriell mutiert, und anschließend *in vitro* die Effizienz des Toc75-Einbaus in die äußere Chloroplastenmembran analysiert. Die Mutation der beiden ersten Triplets hatte nur schwache Misslokalisierungseffekte zur Folge, wohingegen die Mutation des letzten Triplets zu fast vollständiger Misslokalisierung ins Stroma führte (Baldwin & Inoue, 2006). Wie sich allerdings für ptOmp85 herausstellte, liegt dessen tripel-Glycin-Motiv im Bereich der aa 69-71 hinter dem Signalpeptid, d.h. 10 aa hinter dem Punkt, an dem die Relokalisierung von stromal zu extra-stromal auftrat. Da das tripel-Glycin-Motiv im extra-stromal lokalisierten Fusionskonstrukt ptOmp-TP62-GFP nicht präsent war, scheint dieses Motiv für die Zielsteuerung von ptOmp85 also keine oder keine ausschließliche Funktion zu besitzen.

Eine Analyse der Hydrophobizität der 100 N-terminalen Aminosäuren zeigte stattdessen, dass im Bereich vor dem Transitionspeptid, also dem Punkt in der Aminosäuresequenz, an dem die Lokalisation wechselte, ein stark hydrophober Abschnitt von etwa 10 Aminosäuren Länge zu finden ist. Ein solcher hydrophober Abschnitt ist insofern interessant, da sich hieraus direkt eine mögliche Funktion als Stop-Transfer-Sequenz schlussfolgern ließe, wie man sie z.B. auch vom ER-Proteinimport kennt. Um die Bedeutung des hydrophoben Bereichs näher zu analysieren, wurde die entsprechende Sequenz heterolog hinter eine andere, stromal dirigierende BTS kloniert. Hiermit konnte die Vermutung der intraorganellären Zielsteuerungskompetenz des Elements bestätigt werden: GFP, das an eine hybride Zielsteuerungssequenz aus der BTS des Proteins FcpD und 27 Aminosäuren aus dem entsprechenden Bereich des ptOmp85-N-Terminus (TP50 – TP77) fusioniert wurde, zeigte eine ähnliche extra-stromale Lokalisation wie ptOmp85. In diesem Sinn ließen sich die Zielsteuerungssequenzen von ptOmp85 also korrekterweise als TTS zusammenfassen, als *tripartite targeting sequence* (dreigeteilte Zielsteuerungssequenz).

Interessanterweise findet man im Gegenzug am N-Terminus aller bisher untersuchten Toc75-Proteine aus Pflanzen, analog zur Situation in ptOmp85, einen deutlichen hydrophoben Bereich vor dem poly-Glycin-Motiv (siehe Abb. 6-2). Die Mutation dieses Bereichs hatte aber umgekehrt keinen Effekt auf die Membranlokalisation von psToc75 (Inoue & Keegstra, 2003).

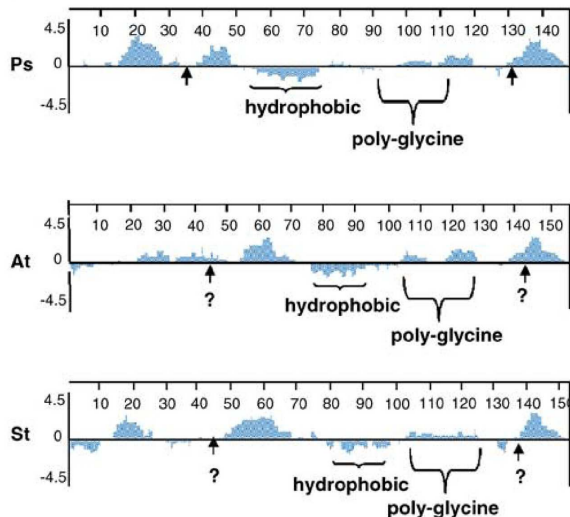


Abb. 6-2: Hydropathie-Plot der N-terminalen 150 aa von drei verschiedenen pflanzlichen Toc75-Proteinen

Die N-Termini der drei Toc75-Proteine aus *P. sativum*, *A. thaliana* und *Solanum tuberosum* weisen eine starke Homologie in Bezug auf die Verteilung hydrophiler und hydrophober Bereiche auf. Bei allen dreien findet sich vor dem poly-Glycin-Motiv ein deutlicher hydrophober Bereich. Aus Inoue & Keegstr, 2003.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Befunden schließen, dass Toc75 und ptOmp85 einem ähnlichen, und daher vermutlich homologen, zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus unterliegen, wobei sich die jeweiligen Zielsteuerungssequenzen allerdings unterscheiden. Während bei Toc75 ein poly-Glycin-Motiv als entscheidendes Signal identifiziert wurde (Inoue & Keegstra, 2003), konnte ein solches Motiv bei ptOmp85 nicht gezeigt werden. Der stark hydrophobe Bereich direkt vor dem identifizierten Transitionspunkt lässt hier eher darauf schließen, dass der zweite Zielsteuerungsschritt von ptOmp85 z.B. durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der inneren Membran oder mit anderen plastidären Proteinen vermittelt wird. Der konservierte Mechanismus als solcher, sowie auch der Umstand, dass man einen ähnlichen hydrophoben Bereich in vergleichbaren Regionen auch bei pflanzlichen Toc75-Proteinen findet, lassen vermuten, dass sich dieser zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus bereits im letzten gemeinsamen Vorläufer der Archaeplastida vor der Auftrennung in Chlorophyten und Rhodophyten entwickelt hat, auch wenn die spezifischen intraorganellären Zielsteuerungselemente nachfolgend eine unterschiedliche Entwicklung nahmen.

Für diese These spricht auch ein weiterer Befund: Aus Pflanzen ist inzwischen die IMS-lokalisierte Peptidase bekannt, die das poly-Glycin-Motiv von Toc75 an einem konservierten A-X-A-Motiv (Nielsen *et al.*, 1997) abspaltet (Inoue *et al.*, 2005). Diese ist eine

Serinpeptidase vom bakteriellen Typ „Signalpeptidase I“, die im Periplasma gram-negativer Bakterien die Signalpeptide sekretierter Proteinen prozessieren (Chang *et al.*, 1978). Ein Homolog dieser plastidären Signalpeptidase 1 konnte nun auch in *P. tricornutum* identifiziert und mithilfe des *self-assembling split GFP*-Systems im Intermembranraum der komplexen Plastide lokalisiert werden. Zudem befindet sich zwischen dem intraorganellären Zielsteuerungselement und dem ersten POTRA-Motiv von ptOmp85 bei aa 110 – 112 des volle-Länge Proteins, wie bei Toc75, eine entsprechende putative Signalpeptidase 1 Erkennungssequenz (A-X-A). Eine funktionelle Analyse der prozessierenden Eigenschaften von ptSP1, insbesondere in Bezug auf ptOmp85, wurde allerdings noch nicht gezeigt. Dennoch scheinen die beiden Systeme aus Pflanzen und der Diatomee auch in dieser Hinsicht vergleichbar, was als weiterer Beleg für dessen Konservierung gedeutet werden kann.

Alle bisherigen Erkenntnisse waren bereits starke Indizien dafür, dass ptOmp85 tatsächlich ein integrales Protein der drittäußersten Membran der komplexen Plastide sein könnte:

1. Die Immunodetektion von ptOmp-FL-GFP in der Fraktion integraler Membranproteine zeigt, dass das volle-Länge Protein tatsächlich integraler Bestandteil einer Membran ist, und die beobachtete *in vivo*-Lokalisation zeigt, dass es sich hierbei um eine der drei inneren Plastidenmembranen handeln muss.
2. Die drittäußerste Plastidenmembran ist, wie einführend bemerkt, homolog zur äußeren Membran primärer Plastiden, die wiederum auf die äußere Membran des cyanobakteriellen Endosymbionten bzw. auf eine Fusion von äußerer Cyanobakterienmembran und phagotropher Vakuolenmembran zurückgeht. Das Homologiemodell identifiziert ptOmp85 als β -barrel-Protein, und solche β -barrel-Membranproteine konnten bislang ausschließlich in den äußeren Membranen gram-negativer Bakterien sowie von diesen abgeleitete Organellen nachgewiesen werden (Wimley, 2003).
3. Weiterhin schränkt das stromale Zielsteuerungssignal, das Phenylalanin an der +1-Position des Transitpeptides, und der beobachtete, mit Toc75 vergleichbare Zwei-Schritt Zielsteuerungsmechanismus die möglichen Zielmembranen weiter auf die beiden innersten Plastidenmembranen ein; ein Mechanismus, der ein Membranprotein zunächst ins Plastidenstroma dirigiert, und es anschließend wieder in das PPC transportiert und von dort in die periplastidäre Membran integriert, konnte weder je beobachtet werden, noch erscheint er plausibel.

Um die Hypothese weiter zu untermauern, dass ptOmp85 ein integraler Bestandteil der drittäußersten Plastidenmembran ist, wurde das sogenannte *self-assembling split GFP*-System (sasGFP) für *Phaeodactylum tricornutum* adaptiert. Vorversuche und Kontrollexperimente zeigten, dass das System in verschiedenen zellulären und subplastidären Kompartimenten von *P. tricornutum* voll funktionstüchtig ist. Sowohl im Cytosol als auch im PPC und im Stroma konnte die Fluoreszenz des GFP wiederhergestellt werden, wenn beide Fragmente gleichzeitig in das jeweilige Kompartiment dirigiert wurden. Wurden hingegen beide Fragmente in verschiedene subplastidäre Kompartimente dirigiert, konnte keine Fluoreszenz wiederhergestellt werden, wodurch die Integrität des Systems sichergestellt war. Zudem konnten mittels dieses Systems erstmals zwei Markerproteine für den Intermembranraum zwischen der dritten und vierten Membran gezeigt werden, ptMGD1 und ptSP1. Beide Proteine sind in Pflanzen im Intermembranraum der Chloroplasten lokalisiert. In *P. tricornutum* besitzen beide ein Phenylalanin an der +1-Position des Transitpeptides, was eine stromale Lokalisation vermuten ließe. Die Fluoreszenz von ptMGD1-GFP zeigte jedoch eindeutig eine extra-stromale, die Chlorophyllfluoreszenz umgebende Lokalisation. Die co-Expression von ptMGD1-S1-10 und ptSP1-S11 erzeugte ein gleiches Fluoreszenzsignal, so dass geschlossen werden kann, dass tatsächlich beide Proteine im IMS lokalisiert sind.

Die Anwendung des sasGFP-Systems mit entsprechenden C-terminal fusionierten ptOmp85-FL-S11 Konstrukten zeigte, dass die Fluoreszenz des GFP weder mit einem stromal lokalisierten noch mit einem IMS lokalisierten GFP-S1-10 wiederhergestellt werden konnte. Dieser negative Befund lässt also schließen, dass der ptOmp85-C-Terminus weder im Stroma noch im IMS lokalisiert ist, und schließt somit eine Integration des Proteins in der innersten Membran aus. Im Gegensatz dazu konnte mit einem PPC-lokalisierten GFP-S1-10 die GFP-Fluoreszenz wiederhergestellt werden, womit eine Lokalisation des ptOmp85-C-Terminus in diesem Kompartiment nachgewiesen ist. Eine solche Lokalisation ist nur dann möglich, wenn ptOmp85 entweder in der zweiten oder in der dritten Membran der komplexen Plastide integriert wäre. Da aber eine Integration in der periplastidären Membran aus oben genannten Gründen höchst unwahrscheinlich erscheint, bleibt als mögliche Zielmembran von ptOmp85 letztlich nur die dritte Plastidenmembran. Abb. 6-3 fasst diese Erkenntnisse in einer Modellvorstellung zusammen.

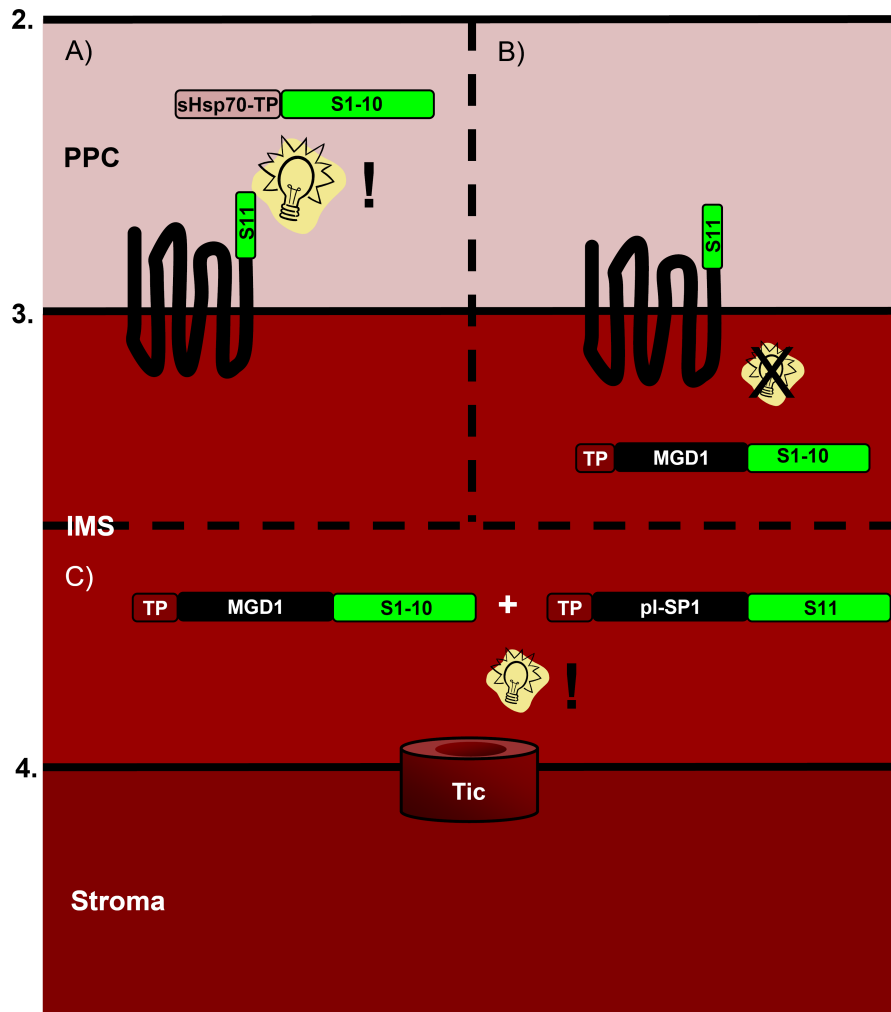


Abb. 6-3: Schematische Zusammenfassung der ptOmp85-sasGFP Lokalisationsexperimente

Wie unter 5.2.5 beschrieben, ließ sich bei den durchgeführten sasGFP-Experimenten mit ptOmp85-S11 die Fluoreszenz nur dann wiederherstellen, wenn GFP-S1-10 ins PPC dirigiert wurde (A), nicht aber mit S1-10 im IMS (B). Zusätzlich konnten mithilfe des Systems die ersten bekannten IMS-Markerproteine aus *P. tricornutum*, ptMGD1 und ptSP1, identifiziert werden (C). Zusammen mit den weiteren *in vivo*- und *in vitro*-Lokalisationsexperimenten lässt sich schließen, dass ptOmp85 in der dritten Membran der komplexen Plastide lokalisiert, wobei die Protein-Termini ins PPC ragen.

Da das Homologiemodell eine β -barrel-Domäne mit 16 Transmembran- β -Faltblättern vorhersagt, müssten folglich sowohl N- als auch C-Terminus auf der gleichen Seite der Membran lokalisieren. Um diese Vorhersage zu testen, wurde das sasGFP-System entsprechend modifiziert, um das Fragment S11 an den putativen N-Terminus zu fusionieren. Da, wie unter 5.2.5 beschrieben, der korrekte N-Terminus des reifen ptOmp85-Proteins nur abgeschätzt werden konnte, wurden zwei verschiedene N-terminal fusionierte ptOmp85-Konstrukte hergestellt. Das erste trägt das S11-Fragment hinter aa Phe113, das zweite hinter aa Gln95. Hier konnte gezeigt werden, dass sich mit dem ersten Konstrukt, genau wie bei der C-terminal fusionierten Variante, die GFP-Fluoreszenz ausschließlich dann wiederherstellen ließ, wenn S1-10 ins PPC dirigiert wurde. Mit S1-10 im Stroma oder im IMS blieb auch hier

die Fluoreszenz aus. Dies zeigt zum einen, dass tatsächlich beide Termini auf der gleichen Seite der Membran lokalisiert sind, was also eine gerade Anzahl von Transmembransträngen bestätigt. Zum anderen zeigt es, dass das S11-Fragment tatsächlich erfolgreich nahe dem tatsächlichen ptOmp85-N-Terminus inseriert worden sein musste.

Im Kontrast dazu konnte mit der zweiten N-terminal fusionierten ptOmp85-Variante in keinem Fall die Fluoreszenz wiederhergestellt werden, was dafür sprechen könnte, dass es im reifen Protein nicht mehr enthalten war, sondern als Teil der dreigeteilten Zielsteuerungssequenzen abgespalten wurde. Dies grenzt den Bereich des tatsächlichen N-Terminus des reifen Proteins auf ~20 aa ein, und rückt erneut das bereits oben erwähnte A-X-A-Motiv an Position 110 – 112 des volle-Länge Proteins in den Focus, dass genau in diesem Bereich liegt, und als Erkennungssequenz für die IMS-lokalisierte Signalpeptidase 1 dienen könnte. *In vitro*-Prozessierungsstudien mit aufgereinigter ptSP1 und ptOmp85 könnten hier Aufschluss geben.

Obwohl diese Erkenntnisse einen eindeutigen Schluss auf die Topologie von ptOmp85 zulassen, sind sie dennoch überraschend, da sämtliche bisher untersuchten Omp85-Proteine aus Mitochondrien, gram-negativen Bakterien und auch Cyanobakterien eine umgekehrte Orientierung aufweisen (Schulz, 2002; Voulhoux *et al.*, 2003; Habib *et al.*, 2006).

Dies würde also bedeuten, dass das plastidäre Omp85-Homolog (zumindest in *P. tricornutum*) eine Inversion erfahren haben muss, und nun mit genau entgegengesetzter Topologie in die Membran integriert ist. Obwohl die Umkehrung der Topologie eines Membranproteins nicht trivial erscheint, so wirkt sie im Fall der plastidären Toc75-Proteine doch plausibel. Toc75-Proteine sind bisher die einzigen bekannten Vertreter der Omp85-Familie, die eine vom ursprünglichen Typ abgewandelte Funktion übernommen haben. Alle Vertreter der bakteriellen und mitochondrialen Omp85-Proteine sind als die zentrale Komponente der Biogenese des Proteoms der äußeren Bakterien- bzw. Mitochondrienmembran beschrieben. Bei Bakterien bedeutet dies, dass Omp85-Proteine mit anderen Membranproteinen interagieren müssen, die aus dem Cytoplasma in das Periplasma sekretiert werden. Hierbei wird der POTRA-Domäne eine zentrale Rolle zugeordnet, etwa als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen oder auch als molekulare Chaperone, die die Faltung der zu inserierenden Membranproteine unterstützt (Ris & Plaut, 1962; Yang & Braun, 2000; Knowles *et al.*, 2008). In dieser Hinsicht ist eine Orientierung der beiden Termini hin zum Periplasma einleuchtend. Diese These wird weiterhin dadurch gestützt, dass die Biogenese des Proteoms der äußeren Membran von Mitochondrien nach dem gleichen Prinzip verläuft.

Die Proteine der äußeren Mitochondrienmembran sind nicht im Mitochondrium, sondern im Kerngenom codiert, erreichen ihre Zielmembran also nach der Synthese im Cytosol von der Außenseite. Da aber in Mitochondrien die Orientierung des Omp85-Homologs Sam50 konserviert geblieben ist, können die mitochondriellen β -barrel-Proteine nicht von außen in die Membran integriert werden, sondern müssen zunächst über den Translokator der äußeren Mitochondrienmembran, Tom40, in den Intermembranraum transportiert werden. Erst von hier können sie, analog zum bakteriellen System, in ihre Zielmembran integriert werden (Rapaport & Neupert, 1999; Model *et al.*, 2001; Walther *et al.*, 2009).

Im Gegensatz dazu hat sich die eigentliche Funktion von Toc75 gegenüber den Sam50-artigen Proteinen stark weiterentwickelt, so dass hier nun nicht mehr die **Integration** von Proteinen **in** die äußere Organellenmembran im Vordergrund steht, sondern vielmehr der **Transport** plastidärer Proteine **über** die äußere Membran. Sollte die POTRA-Domäne von Toc75, wie dies auch bei den Sam50-artigen Omp85-Proteinen vermutet wird, eine Funktion bei der Erkennung, Bindung und/oder Integration der Substrate haben, so ist auch eine invertierte Topologie des Proteins plausibel. Denn die Substrate, also die zu transportierenden Proteine treffen von der cytosolischen Seite auf die äußere Plastidenmembran, und müssten folglich auch dort wahrgenommen werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Toc75-POTRA-Domäne plastidäre Vorläuferproteine spezifisch binden kann (Ertel *et al.*, 2005), und dass diese Interaktion die elektrophysiologischen Eigenschaften der β -barrel-Pore modulieren kann (Hinnah *et al.*, 2002).

Interessant in diesem Zusammenhang erscheint auch die Biogenese des *outer membrane*-Proteoms von Chloroplasten. Anders nämlich als bei Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran fand man bei Chloroplasten bislang keinen vergleichbaren Importweg über Einbeziehung des Intermembranraums. Stattdessen scheinen sämtliche soweit untersuchten Proteine der äußeren Chloroplastenmembran direkt von der cytosolischen Seite der Membran her integriert zu werden, wobei allerdings verschiedene Importmechanismen parallel zu existieren scheinen, die sich in ihrer Abhängigkeit von proteinösen Bestandteilen der äußeren Membran, Energie in Form von ATP und/oder einer Beteiligung von Toc75 unterscheiden (Hofmann & Theg, 2005). Die einzige bekannte Ausnahme hierzu bildet bisher Toc75 selbst, dass, wie oben beschrieben, zunächst in den Intermembranraum transportiert werden muss und erst von dort in die äußere Membran integriert werden kann. Wenn allerdings Toc75 in der Membran invertiert wurde, und folglich keine ursprüngliche, Sam50-spezifische Funktion mehr ausüben kann, stellt sich die Frage, wie dann Toc75 selbst in die Membran integriert wird. Ein vielversprechender Kandidat

hierfür könnte ein weiteres Protein sein, dass man in der äußeren Chloroplastenmembran nachweisen konnte: OEP80. Auch OEP80 gehört zur Familie der Omp85-Proteine, ist aber kein Bestandteil des Toc-Translokons (Eckart *et al.*, 2002), und unterscheidet sich auch sonst von Toc75. So weist OEP80 wesentlich größere Sequenzähnlichkeiten zu bakteriellen Omp85-Proteinen als zu pflanzlichen Toc75-Proteinen auf (Eckart *et al.*, 2002). Ähnlich wie eine Toc75-Deletion führt auch die Deletion von OEP80 zu embryonaler Letalität, allerdings in einem späteren Embryostadium (Patel *et al.*, 2008). Zudem scheint OEP80, anders als Toc75, direkt von der cytosolischen Seite her in die äußere Plastidenmembran integriert zu werden (Inoue & Potter, 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde vermutet, dass OEP80 nicht wie Toc75 am generellen Import plastidärer Proteine beteiligt ist, sondern vielmehr eine Funktion entsprechend der von Sam50-artigen Proteine erfüllt (Hsu *et al.*, 2008). Somit böte diese Hypothese ein stimmiges Gesamtkonzept:

Durch die Inversion von Toc75 konnte das Protein demnach zur generellen Importpore in der äußeren Chloroplastenmembran evolvieren, da nun die cytoplasmatisch orientierte POTRA-Domäne als geeignete Rezeptor- und/oder Chaperondomäne für plastidäre Vorläuferproteine fungieren konnte. Gleichzeitig wurde somit die Möglichkeit geschaffen, auch Proteine der äußeren Plastidenmembran, anders als bei Mitochondrien, direkt von der cytoplasmatischen Seite in die Membran zu integrieren. Lediglich Toc75 selbst unterliegt noch dem ancestralen Importweg, und bedarf daher eines Omp85-Proteins mit ursprünglicher Funktion. Somit bestünde die Funktion von OEP80 in der Integration von Toc75 in die Membran vom Intermembranraum aus.

Allerdings muss hier einschränkend festgehalten werden, dass OEP80-Homologe bisher nur in Vertretern der Chlorophyta eindeutig identifiziert werden konnte, nicht aber in Rotalgen oder Chromalveolaten. Und auch weitere Vorhersagen dieser Hypothese bleiben bisher ungeklärt. So müsste zunächst gezeigt werden, dass die gefundene ptOmp85-Orientierung kein *P. tricornutum*-Spezifikum darstellt, sondern eine generelle Eigenschaft von Toc75-Proteinen ist. Diese Hypothese ist zwar schon früher formuliert worden (Reumann *et al.*, 1999; Voulhox *et al.*, 2003), indirekte Hinweise zur Orientierung sind bislang allerdings uneindeutig (siehe etwa (Sveshnikova *et al.*, 2000; Hinnah *et al.*, 2002)), direkte experimentelle Beweise stehen noch aus. Entsprechende, an Pflanzen angepasste, Analysen mit *self-assembling split GFP* könnten auch hier weitere Aufklärung bringen. Analog dazu könnte man auf die gleiche Weise eine zu postulierende, konservierte Orientierung von OEP80 analysieren.

Zudem müsste gezeigt werden, dass OEP80 tatsächlich eine Funktion in der Toc75-Integration besitzt. Funktionelle Analysen aber gestalten sich aufgrund des essentiellen Charakters des Proteins schwierig. Einen möglichen Ausweg hierzu könnten RNAi-basierte Ansätze zum Beispiel in *Clamydomonas reinhardtii* liefern.

6.3 Die elektrophysiologischen Messungen bestätigen die Toc75-artigen Eigenschaften von ptOmp85

Die bisherigen Resultate hatten bereits zahlreiche Homologien zwischen ptOmp85 und Toc75 aus Pflanzen aufgezeigt. So ließen schon die vorhergesagte Struktur, die Stellung von ptOmp85 im phylogenetischen Stammbaum, die Lokalisierung in der drittäußeren Plastidenmembran und der Toc75-ähnliche zwei-Schritt Importmechanismus den Schluss zu, dass es sich bei ptOmp85 und Toc75 nicht bloß um Homologe, sondern tatsächlich um funktionelle Orthologe handelt. Ein weiteres Kriterium, mit dem sich Sam50-artige und Toc75-artige Omp85-Proteine unterscheiden lassen, sind ihre elektrophysiologischen Charakteristika. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sich die unterschiedlichen Funktionen der beiden Subtypen, also Membranproteininsertion *versus* Proteintranslokation, auch in elektrophysiologischen Parametern wie z.B. dem Leitwert der Pore widerspiegeln. Mit Hinblick auf diese Unterscheidungsmöglichkeiten wurde auch ptOmp85 in artifizielle Biomembranen inkorporiert und elektrophysiologisch charakterisiert, um zu überprüfen, ob das Protein i) tatsächlich eine Pore in der Membran bilden kann, und ii) ob ggf. die Poreneigenschaften mit denen von Sam50- oder Toc75-artigen Proteinen vergleichbar sind. Während die Biomembran innerhalb der Messapparatur normalerweise die zwei Hälften der Messkammer elektrisch voneinander isoliert, also keinen Stromfluss zwischen beiden Halbkammern zulässt, konnte nach erfolgter Inkorporation ein Stromfluss registriert werden. ptOmp85 bildete also tatsächlich eine stromdurchlässige Pore in der Membran. Hierbei zeigte sich zunächst, dass ptOmp85 grundlegende Eigenschaften aufweist, die bisher bei allen soweit untersuchten Vertretern der Omp85-Familie nachgewiesen werden konnten. So ließ sich etwa das Umkehrpotential von ptOmp85 auf ~38 mV bestimmen, ein Wert, der mit anderen Omp85-Proteinen gut übereinstimmt (siehe Tab. 6-1)

Weiterhin ergibt sich aus diesem Umkehrpotential, wie bei den übrigen Omp85-Proteinen auch, eine Kationenselektivität, wobei diese bei Vertretern der beiden Subtypen uneinheitlich stark ausgeprägt ist. Obwohl hierzu keine näheren Studien existieren, ist dieser Befund gerade in Hinsicht auf Toc75-Proteine interessant, da sich aus dieser Kationenselektivität eine

funktionelle Relevanz für die beobachtete positive Nettoladung von pflanzlichen Transitpeptiden ableiten ließe.

Tabelle 6-1: Elektrophysiologische Charakteristika verschiedener Omp85-Proteine

Protein	Organismus	Umkehrpotential U _{rev} [mV]	Selektivität [P _K :P _{Cl}]	Hauptleitwert g [pS]	Porendurchmesser d [nm]
Alr2269*	<i>Anabaena spec</i>	17	2,2	500	1,7
Toc75 [§]	<i>Pisum sativum</i>	48	14,3	440	1,54
YaeT*	<i>Escherichia coli</i>	45	11,2	90	0,5
Sam50*	<i>Drosophila melanogaster</i>	40	7,9	140	0,7
ptOmp85	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	38	6,9	467	1,5

* = aus (Bredemeier *et al.*, 2007); [§] = aus (Hinnah *et al.*, 2002)

Ganz klar unterscheiden lassen sich die beiden Subtypen hingegen anhand des Leitwertes der Pore, der bei Toc75-artigen ca. fünfmal größer ist, als bei Sam50-artigen. Für ptOmp85 konnte ein Leitwert von ~467 pS ermittelt werden, ein Wert, der genau im Bereich der Leitwerte von anderen Toc75-Proteinen liegt (siehe Tab. 6-1). Der Leitwert ist zudem proportional zum Durchmesser der Pore, und dieser lässt sich daher aus jenem errechnen. Dabei ergab sich für ptOmp85 ein Porendurchmesser von ~1,5 nm. Auch der Durchmesser entspricht klar den bekannten Werten von Toc75-artigen Proteinen, und stellt mithin eine Größe dar, die die Passage ungefalteter Polypeptidketten erlaubt.

6.4 ptOmp85 – Der Proteintranslokator der drittäußersten Plastidenmembran?

Ausgehend von der initialen Identifizierung des offenen Leserahmens für ein putatives Omp85-Protein in *P. tricornutum* durch Wunder *et al.* konnte das entsprechende Protein im Rahmen dieser Arbeit eingehend charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass ptOmp85 ein Vertreter der Omp85-Familie ist, der in vielen verschiedenen Eigenschaften mit Proteinen der Toc75-Subfamilie, nicht aber der Sam50-Subfamilie übereinstimmt.

Im Rahmen der methodischen Möglichkeiten wurde nachgewiesen, dass ptOmp85 mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ein integrales Protein der dritten Plastidenmembran von

Phaeodactylum tricornutum ist, und dort eine Pore mit zu Toc75 vergleichbaren elektrophysiologischen Eigenschaften und vergleichbarem Durchmesser bildet.

In summa zeichnen diese Ergebnisse ein sehr deutliches Bild, dass es sich bei ptOmp85 tatsächlich um die zentrale, Protein-translozierende Komponente des Translokons der drittäußersten Membran der komplexen Plastide handelt. Für diese Hypothese spricht zudem ein weiteres Indiz: wie einleitend unter 1.3.2 beschrieben, greift im PPC ein Sortierungsmechanismus, der bewerkstelligt, dass ausschließlich stromale Proteine über die beiden inneren Membranen transportiert werden. Ausschlaggebend hierfür ist eine aromatische Aminosäure (oder Leucin) an der +1-Position des Transitpeptides. Dieses Sequenzmerkmal ist kein Alleinstellungsmerkmal von Diatomeen, sondern ist auch von Transitpeptiden der Rhodophyten und Glaucophyten bekannt (Patron & Waller, 2007). In Glaucophyten, wo ein solches Phenylalanin sogar in 100% aller bisher beschriebenen plastidären Proteine vorhanden ist, konnte gezeigt werden, dass dieser Aminosäurerest essentiell für den Proteinimport in Cyanellen ist (Steiner *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnten Wunder und Kollegen zeigen, dass diese Phenylalaninabhängigkeit vermutlich auf einer direkten, spezifischen Interaktion des Phenylalaninrests mit dem Omp85-abgeleiteten Translokator der äußeren Plastidenmembran beruht. Fehlt dieser spezifische Rest, ist die Interaktion zwischen Transitpeptiden und Omp85-Proteinen erheblich reduziert (Wunder *et al.*, 2007). Dass diese Phenylalaninabhängigkeit auch in den komplexen Plastiden der Heterokontophyten besteht, ist also ein weiteres Anzeichen dafür, dass der Transport über die dritte Plastidenmembran tatsächlich von einem Omp85-Protein vermittelt wird. Gleichzeitig kann im Umkehrschluss aus der Phenylalaninabhängigkeit dieser Omp85-artigen Translokatoren erstmals eine überzeugende mechanistische Erklärung für die beobachtete Diskriminierung zwischen PPC-residenten und stromalen Proteinen geschlossen werden. Demnach können ausschließlich Proteine mit aromatischer Aminosäure oder Leucin an der +1-Position des TPs spezifisch mit ptOmp85 interagieren und somit transportiert werden, wohingegen diese Interaktion bei Proteinen ohne eine solche Aminosäure ausbleibt, weshalb sie im PPC verbleiben.

Somit ergeben die Ergebnisse dieser Arbeit ein schlüssiges Gesamtkonzept über die mechanistischen Grundlagen der Proteintranslokation an der dritten Plastidenmembran von Chromalveolaten, und tragen dadurch fundamental zum Verständnis des Proteinimports in komplexe Plastiden bei.

7 Ausblick

Obwohl die in dieser Arbeit durchgeführten Studien eine recht umfangende Charakterisierung von ptOmp85 bieten, bleiben doch einige Aspekte noch ungeklärt.

So stellt sich zunächst die zentrale Frage nach der tatsächlichen Importkompetenz des Proteins. Obwohl bisher alle Ergebnisse für eine zu Toc75 orthologe Funktion sprechen, steht der experimentelle Nachweis hierfür noch aus. Entsprechende Versuche, die diese Funktion nachweisen würden, gestalten sich allerdings schwierig. Auf biochemischem Wege ließe sich z.B. ggf. eine spezifische Interaktion von ptOmp85 mit stromalen Vorläuferproteinen nachweisen. Ein Beweis für den tatsächlichen Import durch die C-terminale Pore von ptOmp85 wäre aber auch hiermit nicht gegeben.

Der gängige Weg, die Funktion über spezifische Deletionsmutationen und Komplementationsversuche zu eruieren, stellt im Modellorganismus *P. tricornutum* keine Option dar, da sich hier bisher keine zielgerichteten Mutationen induzieren lassen, und auch kein effizientes Verfahren der negativen Genregulierung etwa mittels RNA-Interferenz beschrieben ist. Auch eine heterologe Komplementation scheidet aus, da auch in anderen Diatomeen oder freilebenden Rotalgen bisher keine genspezifischen Deletionsmutationen etabliert sind.

Als vielversprechendes Alternativsystem böte sich für derartige Experimente der Apicomplexe *Toxoplasma gondii* an, da in diesem Modellorganismus effiziente Techniken zur Generierung konditionaler Deletionsmutanten etabliert sind, die die Analyse selbst essentieller Proteinen ermöglichen (Mazumdar & Wilson, 2006). Auf diese Weise konnte in *T. gondii* bereits eine Rolle von apicoplastidären SELMA-Komponenten und einem Tic20-Homolog beim Proteinimport in den Apicoplasten nachgewiesen werden (van Dooren *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*, 2009).

Von diesem zentralen Aspekt abgesehen, bleiben auch weitere Fragen offen bzw. werden hier neu aufgeworfen. Unter strukturellen Gesichtspunkten stellt z.B. der ungewöhnliche, ca. 50 aa lange Sequenzabschnitt im Bereich von POTRA-Motiv 2 ein interessantes Merkmal dar. Kommt diesem eine Funktion zu und, wenn ja, welche? Interessant wäre in dieser Hinsicht die Aufklärung der Kristallstruktur der POTRA-Domäne von ptOmp85, um einen Einblick in deren räumliche Faltung zu erhalten. Als funktionelle Eigenschaften wären z.B. eine Beteiligung an der Substraterkennung oder eine regulierende Wirkung auf den Öffnungszustand der Porendomäne denkbar, die mit entsprechenden biochemischen Bindungsstudien bzw. weiteren elektrophysiologischen Analysen untersucht werden könnten.

Auch der Mechanismus des zwei-Schritt Importmechanismus von ptOmp85 und Toc75 bedarf weiterer Untersuchungen. Insbesondere die konkreten Eigenschaften der intraorganellären Zielsteuerungselemente sowie der mit diesen wechselwirkenden putativen Faktoren könnten von Interesse sein. Analog zu Studien an psToc75 bieten sich hierfür auch bei ptOmp85 Mutageneseexperimente an, bei denen gezielt die physikochemischen Eigenschaften der putativen IMS-Zielsteuerungssequenz variiert werden, und deren Einfluss auf die Lokalisation eines Reporters untersucht werden könnten. Darüber hinaus wäre interessant zu untersuchen, ob auch bei *P. tricornutum* die identifiziert IMS-lokalisierte Signalpeptidase 1, analog zur Situation in Chloroplasten, die Prozessierung von ptOmp85 vermittelt.

Mit Bezug auf den Mechanismus der Proteintranslokation durch Toc75 sowie die Membraninsertion von Toc75 selbst könnten Topologiestudien weitere Einblicke geben, inwiefern das unter 6.2 postulierte Modell haltbar ist. Da bisher weder die Orientierung von Toc75 noch von OEP80 in der äußeren Chloroplastenmembran bekannt ist, bieten sich vergleichbare Experimente mit dem *self-assembling split GFP*-System, wie sie in dieser Arbeit für ptOmp85 durchgeführt wurden, auch für pflanzliche Systeme wie etwa *A. thaliana* an.

8 Zusammenfassung

Chromalveolaten sind eine hochdiverse Gruppe von Protisten, die als gemeinsames Merkmal eine sogenannte komplexe Plastide tragen. Diese ist das Resultat einer sekundären Endocytobiose zwischen einer eukaryoten Wirtszelle und einer Rhodophyte. Die komplexe Plastide ist, anders als die primären Plastiden der Archaeplastida, i. d. R. von vier Membranen umgeben (eine Ausnahme bilden die Plastiden der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit nur drei Membranen). Wie auch bei den Archaeplastida ist ein Großteil der plastidären Proteine von Chromalveolaten auf dem Kerngenom des Wirtes codiert, und muss daher posttranslational aus dem Cytosol importiert werden. Proteine des Plastidenstromas müssen also vier Membranen passieren.

Während für drei der vier Membranen bereits putative Translokatoren beschrieben werden konnten, war das Translokon der drittäußersten Membran bislang völlig unbekannt. Diese Membran ist der äußeren Membran primärer Plastiden homolog, ein entsprechendes Toc-Translokon konnte allerdings bislang nicht identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kürzlich identifiziertes putatives Omp85-Protein der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* erstmals eingehend analysiert und charakterisiert. Das Protein, ptOmp85, konnte eindeutig der Familie der Omp85- Proteine zugeordnet werden. Innerhalb der Familie weist es die nächsten Verwandtschaftsbeziehungen zum Toc75-Homolog der freilebenden Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* auf.

Es konnte nachgewiesen werden, dass ptOmp85 ein integrales Protein der drittäußersten Membran der komplexen Plastide ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ptOmp85 intraorganellär einem zu Toc75 homologen, Zielsteuerungsmechanismus unterliegt. Die Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften der Membranpore von ptOmp85 zeigte eindeutige Ähnlichkeiten zu den Poreneigenschaften von Toc75-artigen, nicht aber zu denen von Sam50-artigen Omp85-Proteinen.

Diese aufgedeckten Charakteristika implizieren, dass es sich bei ptOmp85 tatsächlich um das Proteintranslokon der drittäußersten Plastidenmembran von Chromalveolaten handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen somit grundlegend zum Verständnis des Proteinimports in die komplexen Plastiden dieser Protistengruppe bei.

9 Referenzen

- 1) **Adl, SM, Simpson, AG, Farmer, MA, Andersen, RA, Anderson, OR, Barta, JR, Bowser, SS, Brugerolle, GUY, Fensome, RA & Fredericq, S (2005).**
The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.
J Euk Microbiol, 52, 399.
- 2) **Agne, B & Kessler, F (2009).**
Protein transport in organelles: The Toc complex way of preprotein import.
FEBS J, 276, 1156-1165.
- 3) **Agrawal, S, van Dooren, GG, Beatty, WL & Striepen, B (2009).**
Genetic evidence that an endosymbiont-derived ERAD system functions in import of apicoplast proteins.
J Biol Chem, 284, 33683-33691.
- 4) **Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W & Lipman, DJ (1997).**
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res, 25, 3389.
- 5) **Bagos, PG, Liakopoulos, TD, Spyropoulos, IC & Hamodrakas, SJ (2004).**
PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins.
Nucleic Acids Res, 32, W400.
- 6) **Baldwin, AJ & Inoue, K (2006).**
The most C-terminal tri-glycine segment within the polyglycine stretch of the pea Toc75 transit peptide plays a critical role for targeting the protein to the chloroplast outer envelope membrane.
FEBS J, 273, 1547-1555.
- 7) **Becker, T, Jelic, M, Vojta, A, Radunz, A, Soll, J & Schleiff, E (2004).**
Preprotein recognition by the Toc complex.
EMBO J, 23, 520-530.
- 8) **Bhaya, D & Grossman, A (1991).**
Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum.
Mol Gen Genet, 229, 400-404.
- 9) **Birnboim, HC & Doly, J (1979).**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res, 7, 1513.
- 10) **Boardman, NK, Francki, RI & Wildman, SG (1966).**
Protein synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves. 3. Comparison of the physical properties and protein synthesizing activities of 70 s chloroplast and 80 s cytoplasmic ribosomes.
J Mol Biol, 17, 470-487.
- 11) **Bölter, B, Soll, J, Schulz, A, Hinnah, S & Wagner, R (1998).**
Origin of a chloroplast protein importer.
PNAS USA, 95, 15831-15836.

- 12) **Bos, MP, Robert, V & Tommassen, J (2007).**
Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain.
EMBO reports, 8, 1149.
- 13) **Bowler, C, Allen, AE, Badger, JH, Grimwood, J, Jabbari, K, Kuo, A, Maheswari, U, Martens, C, Maumus, F & Otillar, RP (2008).**
The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes.
Nature, 456, 239-244.
- 14) **Bredemeier, R, Schlegel, T, Ertel, F, Vojta, A, Borissenko, L, Bohnsack, MT, Groll, M, von Haeseler, A & Schleiff, E (2007).**
Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family.
J Biol Chem, 282, 1882.
- 15) **Cabantous, S, Terwilliger, TC & Waldo, GS (2004).**
Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein.
Nature biotechnology, 23, 102-107.
- 16) **Cavalier-Smith, T (1999).**
Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, Dinoflagellate and Sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree.
J Euk Microbiol, 46, 347-366.
- 17) **Cavalier-Smith, T (2000).**
Membrane heredity and early chloroplast evolution.
Trends Plant Sci, 5, 174-182.
- 18) **Cavalier-Smith, T (2001).**
Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis.
J Mol Evol, 53, 555-595.
- 19) **Cavalier-Smith, T (2002).**
Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses.
Curr Biol, 12, 62-64.
- 20) **Cavalier-Smith, T (2003).**
Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae).
Philos Trans R Soc London Biol, 358, 109.
- 21) **Chaal, BK, Mould, RM, Barbrook, AC, Gray, JC & Howe, CJ (1998).**
Characterization of a cDNA encoding the thylakoidal processing peptidase from *Arabidopsis thaliana*. Implications for the origin and catalytic mechanism of the enzyme.
J Biol Chem, 273, 689.
- 22) **Chang, CN, Blobel, G & Model, P (1978).**
Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent f1 pre-coat protein.
PNAS USA, 75, 361.

- 23) **Chen, X, Smith, MD, Fitzpatrick, L & Schnell, DJ (2002).**
In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts.
Plant Cell, 14, 641.
- 24) **Chou, ML, Chu, CC, Chen, LJ, Akita, M & Li, HM (2006).**
Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts.
J Cell Biol, 175, 893-900.
- 25) **Chun, EH, Vaughan Jr, MH & Rich, A (1963).**
The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations.
J Mol Biol, 7, 130.
- 26) **Clantin, B, Delattre, AS, Rucktooa, P, Saint, N, Meli, AC, Locht, C, Jacob-Dubuisson, F & Villeret, V (2007).**
Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily.
Science, 317, 957.
- 27) **Deschamps, P, Haferkamp, I, Dauvillee, D, Haebel, S, Steup, M, Buleon, A, Putaux, JL, Colleoni, C, d'Hulst, C & Plancke, C (2006).**
Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*.
Eukaryot Cell, 5, 954.
- 28) **Douglas, S, Zauner, S, Fraunholz, M, Beaton, M, Penny, S, Deng, LT, Wu, X, Reith, M, Cavalier-Smith, T & Maier, UG (2001).**
The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus.
Nature, 410, 1091-1096.
- 29) **Douglas, SE & Penny, SL (1999).**
The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae.
J Mol Evol, 48, 236-244.
- 30) **Doyle, JJ & Doyle, JL (1990).**
Isolation of plant DNA from fresh tissue.
Focus, 12, 13-15.
- 31) **Dyrlov Bendtsen, J, Nielsen, H, von Heijne, G & Brunak, S (2004).**
Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.
J Mol Biol, 340, 783-795.
- 32) **Eckart, K, Eichacker, L, Sohrt, K, Schleiff, E, Heins, L & Soll, J (2002).**
A Toc75-like protein import channel is abundant in chloroplasts.
EMBO reports, 3, 557.
- 33) **Emanuelsson, O, Nielsen, H, Brunak, S & von Heijne, G (2000).**
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.
J Mol Biol, 300, 1005-1016.

- 34) **Ertel, F, Mirus, O, Bredemeier, R, Moslavac, S, Becker, T & Schleiff, E (2005).**
The evolutionarily related beta-barrel polypeptide transporters from *Pisum sativum* and *Nostoc PCC7120* contain two distinct functional domains.
J Biol Chem, 280, 28281.
- 35) **Fast, NM, Kissinger, JC, Roos, DS & Keeling, PJ (2001).**
Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids.
Mol Biol Evol, 18, 418.
- 36) **Gardner, MJ, Hall, N, Fung, E, White, O, Berriman, M, Hyman, RW, Carlton, JM, Pain, A, Nelson, KE & Bowman, S (2002).**
Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Nature, 419, 498-511.
- 37) **Gentle, IE, Burri, L & Lithgow, T (2005).**
Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins.
Mol Mikrobiol, 58, 1216-1225.
- 38) **Gould, SB, Sommer, MS, Hadfi, K, Zauner, S, Kroth, PG & Maier, UG (2006).**
Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes.
J Mol Evol, 62, 674-681.
- 39) **Greenwood, AD, Griffiths, HB & Santore, UJ (1977).**
Chloroplasts and cell compartments in Cryptophyceae.
Br Phycol J, 12, 119.
- 40) **Gromiha, MM & Suwa, M (2005).**
A simple statistical method for discriminating outer membrane proteins with better accuracy.
Bioinformatics, 21, 961.
- 41) **Gruber, A, Vugrinec, S, Hempel, F, Gould, SB, Maier, UG & Kroth, PG (2007).**
Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif.
Plant Mol Biol, 64, 519-530.
- 42) **Hackett, JD, Yoon, HS, Li, S, Reyes-Prieto, A, Rummele, SE & Bhattacharya, D (2007).**
Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates.
Mol Biol Evol, 24, 1702.
- 43) **Harper, JT & Keeling, PJ (2003).**
Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids.
Mol Biol Evol, 20, 1730.
- 44) **Heins, L, Mehrle, A, Hemmler, R, Wagner, R, Kuchler, M, Hormann, F, Sveshnikov, D & Soll, J (2002).**
The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids.
EMBO J, 21, 2616-2625.

- 45) **Hempel, F, Bullmann, L, Lau, J, Zauner, S & Maier, UG (2009).**
ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms.
Mol Biol Evol, 26, 1781-1790.
- 46) **Hibberd, DJ & Norris, RE (1984).**
Cytology and ultrastructure of Chlorarachnion reptans (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova).
J Phycol, 20, 310-330.
- 47) **Hille, B (1992).**
Ionic Channels of Excitable Membranes 2nd edn (Sunderland, MA.), Sinauer Associates.
- 48) **Hille, B (2001).**
Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd edit.
Sinauer, Sunderland, MA.
- 49) **Hinnah, SC, Wagner, R, Sveshnikova, N, Harrer, R & Soll, J (2002).**
The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides.
Biophys J, 83, 899-911.
- 50) **Hofmann, CJB, Rensing, SA, Häuber, MM, Martin, WF, Müller, SB, Couch, J, McFadden, GI, Igloi, GL & Maier, UG (1994).**
The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions.
Mol Gen Genet, 243, 600-604.
- 51) **Hofmann, NR & Theg, SM (2005).**
Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion.
Trends Plant Sci, 10, 450-457.
- 52) **Hsu, SC, Patel, R, Bédard, J, Jarvis, P & Inoue, K (2008).**
Two distinct Omp85 paralogs in the chloroplast outer envelope membrane are essential for embryogenesis in Arabidopsis thaliana.
Plant Sig Behav, 3, 1134.
- 53) **Inoue, K, Baldwin, AJ, Shipman, RL, Matsui, K, Theg, SM & Ohme-Takagi, M (2005).**
Complete maturation of the plastid protein translocation channel requires a type I signal peptidase.
J Cell Biol, 171, 425.
- 54) **Inoue, K & Keegstra, K (2003).**
A polyglycine stretch is necessary for proper targeting of the protein translocation channel precursor to the outer envelope membrane of chloroplasts.
Plant J, 34, 661-669.
- 55) **Inoue, K & Potter, D (2004).**
The chloroplastic protein translocation channel Toc75 and its paralog OEP80 represent two distinct protein families and are targeted to the chloroplastic outer envelope by different mechanisms.
Plant J, 39, 354-365.

- 56) Ishida, K, Cavalier-Smith, T & Green, BR (2000).**
Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromista).
J Phycol, 36, 1135-1144.
- 57) Jarvis, P (2008).**
Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants.
New Phytol, 179, 257-285.
- 58) Katoh, K, Kuma, K, Toh, H & Miyata, T (2005).**
MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment.
Nucleic acids res, 33, 511.
- 59) Kessler, F, Blobel, G, Patel, HA & Schnell, DJ (1994).**
Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery.
Science, 266, 1035-1039.
- 60) Kim, S, Malinverni, JC, Sliz, P, Silhavy, TJ, Harrison, SC & Kahne, D (2007).**
Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine.
Science, 317, 961.
- 61) Knowles, TJ, Jeeves, M, Bobat, S, Dancea, F, McClelland, D, Palmer, T, Overduin, M & Henderson, IR (2008).**
Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes.
Mol Microbiol, 68, 1216-1227.
- 62) Knowles, TJ, Scott-Tucker, A, Overduin, M & Henderson, IR (2009).**
Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly.
Nat Rev Microbiol, 7, 206-214.
- 63) Koebnik, R, Locher, KP & Van Gelder, P (2000).**
Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.
Mol Microbiol, 37, 239-253.
- 64) Kozjak, V, Wiedemann, N, Milenkovic, D, Lohaus, C, Meyer, HE, Guiard, B, Meisinger, C & Pfanner, N (2003).**
An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane.
J Biol Chem, 278, 48520.
- 65) Kroth, PG (2007).**
Genetic transformation: a tool to study protein targeting in diatoms.
Method Mol Biol, 390, 257.
- 66) Kyte, J & Doolittle, RF (1982).**
A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.
J Mol Biol, 157, 105-132.
- 67) Laemmli, UK (1970).**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685.

- 68) **Maier, UG, Douglas, SE & Cavalier-Smith, T (2000).**
The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes.
Protist, 151, 103-109.
- 69) **Manning, JE, Wolstenholme, DR, Ryan, RS, Hunter, JA & Richards, OC (1971).**
Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis*.
PNAS USA, 68, 1169-1173.
- 70) **Marin, B, Nowack, EC & Melkonian, M (2005).**
A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis.
Protist, 156, 425-432.
- 71) **Martin, W & Herrmann, RG (1998).**
Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why?
Plant Physiol, 118, 9-17.
- 72) **Mazumdar, J & Wilson, H (2006).**
Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*.
PNAS USA, 103, 13192.
- 73) **McFadden, GI, Gilson, PR, Hofmann, CJ, Adcock, GJ & Maier, UG (1994).**
Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga.
PNAS USA, 91, 3690.
- 74) **McFadden, GI & van Dooren, GG (2004).**
Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids.
Curr Biol, 14, 514-516.
- 75) **Mereschkowsky, C (1905).**
Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche.
Biol Centralbl, 25, 593-604.
- 76) **Miller, C & Racker, E (1976).**
Ca²⁺-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers.
J Mem Biol, 30, 283-300.
- 77) **Minh, BQ, Vinh, LS, Von Haeseler, A & Schmidt, HA (2005).**
pIQPNNI: parallel reconstruction of large maximum likelihood phylogenies.
Bioinformatics, 21, 3794.
- 78) **Model, K, Meisinger, C, Prinz, T, Wiedemann, N, Truscott, KN, Pfanner, N & Ryan, MT (2001).**
Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane.
Nat Struct Mol Biol, 8, 361-370.
- 79) **Müller, P, Rudin, DO, Tien, HT & Wescott, WC (1963).**
Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution.
J Phys Chem, 67, 534-535.
- 80) **Nakayama, T & Ishida, K (2009).**
Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in *Paulinella chromatophora*.
Curr Biol, 19, 284-285.

- 81) Nassoury, N, Cappadocia, M & Morse, D (2003).**
Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates.
J Cell Sci, 116, 2867.
- 82) Nielsen, H, Engelbrecht, J, Brunak, S & Von Heijne, G (1997).**
Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.
Prot Eng Design Select, 10, 1.
- 83) Palenik, B (2002).**
The genomics of symbiosis: Hosts keep the baby and the bath water.
PNAS USA, 99, 11996.
- 84) Paschen, SA, Waizenegger, T, Stan, T, Preuss, M, Cyrklaff, M, Hell, K, Rapaport, D & Neupert, W (2003).**
Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins.
Nature, 426, 862-866.
- 85) Patel, R, Hsu, SC, Bedard, J, Inoue, K & Jarvis, P (2008).**
The Omp85-related chloroplast outer envelope protein OEP80 is essential for viability in Arabidopsis.
Plant Physiol, 148, 235.
- 86) Patron, NJ, Rogers, MB & Keeling, PJ (2004).**
Gene replacement of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase supports the hypothesis of a single photosynthetic ancestor of chromalveolates.
Eukaryot cell, 3, 1169.
- 87) Patron, NJ & Waller, RF (2007).**
Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals.
Bioessays, 29, 1048-1058.
- 88) Rapaport, D & Neupert, W (1999).**
Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria.
J Cell Biol, 146, 321.
- 89) Reumann, S, Davila-Aponte, J & Keegstra, K (1999).**
The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog.
PNAS USA, 96, 784-789.
- 90) Richter, S & Lamppa, GK (1998).**
A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase.
PNAS USA, 95, 7463.
- 91) Ris, H & Plaut, W (1962).**
Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas.
J Cell Biol, 13, 383.
- 92) Rodriguez-Ezpeleta, N, Brinkmann, H, Burey, SC, Roure, B, Burger, G, Löffelhardt, W, Bohnert, HJ, Philippe, H & Lang, BF (2005).**
Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes.
Curr Biol, 15, 1325-1330.

- 93) **Rogers, MB, Gilson, PR, Su, V, McFadden, GI & Keeling, PJ (2007).**
The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts.
Mol Biol Evol, 24, 54-62.
- 94) **Sagan, L (1967).**
On the origin of mitosing cells.
J Theor Biol, 14, 255.
- 95) **Sanchez-Puerta, MV & Delwiche, CF (2008).**
A hypothesis for plastid evolution in chromalveolates.
J. Phycol, 44, 1097–1107.
- 96) **Sanchez-Pulido, L, Devos, D, Genevrois, S, Vicente, M & Valencia, A (2003).**
POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins.
Trends Biochem Sci, 28, 523-526.
- 97) **Sanger, F, Nicklen, S & Coulson, AR (1977).**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
PNAS USA, 74, 5463.
- 98) **Schimper, AFW (1883).**
Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper.
Bot Ztg, 41, 105–114.
- 99) **Schnell, DJ, Kessler, F & Blobel, G (1994).**
Isolation of components of the chloroplast protein import machinery.
Science, 266, 1007-1012.
- 100) **Shipman, RL & Inoue, K (2009).**
Suborganellar localization of plastidic type I signal peptidase 1 depends on chloroplast development.
FEBS L, 583, 938-942.
- 101) **Smart, OS, Breed, J, Smith, GR & Sansom, MS (1997).**
A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties.
Biophys J, 72, 1109-1126.
- 102) **Sommer, MS, Gould, SB, Lehmann, P, Gruber, A, Przyborski, JM & Maier, UG (2007).**
Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates?
Mol Biol Evol, 24, 918-928.
- 103) **Steiner, JM, Yusa, F, Pompe, JA & Löffelhardt, W (2005).**
Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles.
Plant J, 44, 646-652.
- 104) **Stocking, CR & Gifford, E (1959).**
Incorporation of thymidine into chloroplasts of *Spirogyra*.
Biochem Biophys Res Commun, 1, 159-164.
- 105) **Stoebe, B & Maier, UG (2002).**
One, two, three: nature's tool box for building plastids.
Protoplasma, 219, 123-130.

- 106) Sveshnikova, N, Grimm, R, Soll, J & Schleiff, E (2000).**
Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75.
Biol Chem, 381, 687-693.
- 107) Thomas, KL, Leduc, I, Olsen, B, Thomas, CE, Cameron, DW & Elkins, C (2001).**
Cloning, overexpression, purification, and immunobiology of an 85-kilodalton outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*.
Infect Immun, 69, 4438.
- 108) Tonkin, CJ, Kalanon, M & McFadden, GI (2007).**
Protein targeting to the malaria plastid.
Traffic, 8, 1-10.
- 109) Tonkin, CJ, Struck, NS, Mullin, KA, Stimmler, LM & McFadden, GI (2006).**
Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites.
Mol Microbiol, 61, 614.
- 110) Tranel, PJ & Keegstra, K (1996).**
A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope.
Plant Cell Online, 8, 2093.
- 111) Tyler, BM, Tripathy, S, Zhang, X, Dehal, P, Jiang, RHY, Aerts, A, Arredondo, FD, Baxter, L, Bensasson, D & Beynon, JL (2006).**
Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis.
Science, 313, 1261.
- 112) Van de Peer, Y, Rensing, SA, Maier, UG & De Wachter, R (1996).**
Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae.
PNAS USA, 93, 7732-7736.
- 113) van Dooren, GG, Tomova, C, Agrawal, S, Humbel, BM & Striepen, B (2008).**
Toxoplasma gondii Tic20 is essential for apicoplast protein import.
PNAS USA, 105, 13574-13579.
- 114) Vojta, L, Soll, J & Bolter, B (2007).**
Protein transport in chloroplasts-targeting to the intermembrane space.
FEBS J, 274, 5043.
- 115) Voulhoux, R, Bos, MP, Geurtsen, J, Mols, M & Tommassen, J (2003).**
Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly.
Science, 299, 262.
- 116) Voulhoux, R & Tommassen, J (2004).**
Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly.
Res Microbiol, 155, 129-135.
- 117) Waldspühl, J, Berger, B, Clote, P & Steyaert, JM (2006).**
transFold: a web server for predicting the structure and residue contacts of transmembrane beta-barrels.
Nucleic acids res, 34, W189.

- 118) **Walther, DM, Rapaport, D & Tommassen, J (2009).**
Biogenesis of beta-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence.
Cell Mol Life Sci, 66, 2789-2804.
- 119) **Wastl, J & Maier, UG (2000).**
Transport of proteins into cryptomonads complex plastids.
J Biol Chem, 275, 23194-23198.
- 120) **Wimley, WC (2003).**
The versatile beta-barrel membrane protein.
Curr Opin Struct Biol, 13, 404-411.
- 121) **Wunder, T, Martin, R, Löffelhardt, W, Schleiff, E & Steiner, JM (2007).**
The invariant phenylalanine of precursor proteins discloses the importance of Omp85 for protein translocation into cyanobacteria.
BMC Evol Biol, 7, 236.
- 122) **Yang, FL & Braun, V (2000).**
ShlB mutants of *Serratia marcescens* allow uncoupling of activation and secretion of the ShlA hemolysin.
Int J Med Microbiol, 290, 529.
- 123) **Yoon, HS, Hackett, JD, Ciniglia, C, Pinto, G & Bhattacharya, D (2004).**
A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes.
Mol Biol Evol, 21, 809.
- 124) **Zhang, Z, Green, BR & Cavalier-Smith, T (2000).**
Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids.
J Mol Evol, 51, 26-40.
- 125) **Zuegge, J, Ralph, S, Schmuker, M, McFadden, GI & Schneider, G (2001).**
Deciphering apicoplast targeting signals—feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins.
Gene, 280, 19-26.

10 Anhang

10.1 Oligonukleotide

Self-Assembling Split GFP-Experimente

sGFP-S1-10_Eco_for GAATTCCATATGGGTGGCACCAGTAGC	sHsp70_Nde_rev CATATGTGTTGTCTGCATTACTGGCGCC
sGFP-S1-10_Spe_for ACTAGTCATATGGGTGGCACCAGTAGC	sHsp70_5'_Spe_for ACTAGTATGGTGCATCTTCCATCCTCCTCC
sGFP-S1-10_Hind_rev AAGCTTTTAGGTACCCTTTTCGTTGGG	MGD1_5'_Eco_for GAATTCATGTGCAAACTGTTTTTCC
sGFP-S1-10_SacII_rev CCGCGGTTAGGTACCCTTTTCGTTGGG	MGDG_Nde_rev CATATGGGCACTCCCAGATCAGTG
sGFP-S11_Bam_for CTAGTGGATCCGATGGAGGGTC	SHLP_3'_Bam_rev GGATCCTTTCCCGTTGACCATATCTTTCC
sGFP-S11_Hind_rev AAGCTTGGTACCTTATGTAATCCCAGC	SHLP_5'_Eco_for GAATTCATGAGACTATCGCGAGGTTTCC
sGFP-S11_SacII_rev CCGCGGGGTACCTTATGTAATCCCAGC	SHLP_5'_Spe_for ACTAGTATGAGACTATCGCGAGGTTTCC
Omp-TP30_Nde_rev CATATGGCCATTGTGCGCCACTGTTCCG	MGD1_Bam_rev GGATCCGGCACTCCCAGATCAGTG
sGFP-S11_NdeI_for CATATGGATGGAGGGTCTGGTGGCGGATC	sGFP-S11_3'-Gly_Bam_rev GGATCCGCCACCAGACCCTCCACCTGTAATCCCA GCAGCATTTACG
sGFP-S11_Bam_for_neu CTAGTGGATCCGGTGGAGGGTC	sGFP-S11_5'_Nde_for GTGACCATATGGTCCTTCATG
sUbc4_5'_Eco_for GAATTCATGTACAGATTTCGCGGTG	Omp-sGFP-N-Bam_for GGATCCAAGGGCACGCAGGCTACGC
sUbc4_3'_Bam_rev GGATCCGCAGTTATCATCATGATAGAC	

Omp-sGFP-N-Nde_rev CATATGGTCACGGACGACATCGCCACCACCACG	Omp-AXA_Nde_rev CATATGGTCACGAAAGGCTTTGCCCCAGTACG
Omp_3'_SacII_rev CCGCGGCTAAAAATCAAAATCCGCGCCGAGGCCG	SP1_3'_Nde_rev CATATGAAACATGCCGCCGTTCCCCG
Omp_5'_Spe_for ACTAGTATGAAGACGTCTTCACTTGTACC	SP1_5'_Spe_for ACTAGTATGCCAACAATCAGCGATCACACG
Actin_5'_Eco_for GAATTCATGGCTGACGATGAAGATATCG	P.t.MGD1_Spe_f ACTAGTATGTGCAAACACTGTTTTTCC
Actin_3'_Bam_rev GGATCCGAAGCACTTGCGATGAACAATAG	P.t.MGD1_3'Bam_r GGATCCTGATGTCCGTGTCAATTTAGCTCC
sHsp70_5'_Eco_for GAATTCATGGTGCATCTTCCATCCTCCTCC	P.t.MGD1_3'Nde_r CATATGTGATGTCCGTGTCAATTTAGCTCC
Omp_3'_NotI_rev gcggccgcCTAAAAATCAAAATCCGCGCCGAGGCCG	SPI-3'_r GGATCCTTAAAACATGCCGCCGTTCCCCG
Omp_AXA_Bam_for GGATCCCAATCCTTTTCGAGGAGCCGTCG	SPI_5'_f GAATTCATGCCAACAATCAGCGATCACACG

ptOmp85-BTS-Anylysen

P.t.Omp_TP10_rev GGATCCACCGCGTGGTGAGTTCGACGG	Omp-TP56_rev GGATCCAATAATAGAGGCCAAGAGAG
P.t.Omp_TP20_rev GGATCCAAACGGTTGAGAAAAAAGGCCACC	Omp-TP59_rev GGATCCGTTCTTCCGAATAATAGAGG
P.t.Omp_TP30_rev GGATCCGCCATTGTGCGCCACTGTTCCG	P.t.Omp_TP60_rev GAATTCATCGTTCTTCCGAATAATAG
P.t.Omp_TP50_rev GGATCCAGTCGGACCCTCGAAGCCATC	Omp-TP62_rev GGATCCATCGGTATCGTTCTTCCG
Omp-TP53_rev GGATCCGGCCAAGAGAGTCGGACCCTC	Omp-TP63_rev GGATCCAGCATCGGTATCGTTCTTCC

Omp-TP64_rev

CCATGGCGGAGCATCGGTATCGTTCTTCC

Omp-TP71_rev

GGATCCGCCACCACCACGAAGTCCCG

Omp-TP66_rev

GGATCCTCCCGACGGAGCATCGGTATC

P.t.Omp_TP75_rev

GGATCCCTTGACGACATCGCCACCAC

Omp-TP69_rev

GGATCCACCACGAAGTCCCGACGGAG

ptOmp85-Überexpression

Omp_TP5' _Bam_f

GGATCCTTTTTGCCTCCGTGGAATCACC

Omp_mat_Bam_f

GGATCCTCCTTTTCGAGGAGCCGTCG

Omp_3' _Pst_rev

CTGCAGCTAAAAATCAAATCCGCGCCGAGG

10.2 Proteinidentifikationsnummern

Die Identifikationsnummern der in dieser Arbeit beschriebenen *P. tricornutum*-Proteine beziehen sich auf die *P. tricornutum* Genomdatenbank (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>)

Die Proteinidentifikationsnummern aller weiteren behandelten Proteine finden sich in Tabelle 5-1.

ptMGD1	21505
ptSP1	17972
Actin	51157
AtpC	50958
FcpD	18040
sUbc4	34112
sHsp70	55890
SHLP	40439

10.3 Sequenzvergleich der IMS-lokalisierten pl-SP1-Homologen aus *P. tricornutum* und *A. thaliana*

>gi|30687572| at_pl-SP1

MMVMISLHFSTPPLAFLKSDSNSRFLKNPNPNFIQFTPKSQLLFPQRLNFNTGTNLNRRTLSCYGIKDSSETTKS
APSLDSDGGGGGGDDDDKGEVEEKNRLFPEWLDFTSDDAQTVFVAIAVSLAFRYFIAEPRIYPSLSMYPTFDVG
DRLVAEKVSYYFRKPCANDIVIFKSPPVLQEVGYTDADVFIKRIVAKEGDLVEVHNGKLMVNGVARNEKFILEPP
GYEMTPIRVPENSFVVMGDNRRNNSYDSHVWGPLPLKNIIGRSVFRYWPPNRVSGTVLEGGCAVDKQ

>estExt_gwp_gw1.C_chr_10974| pt_pl-SP1

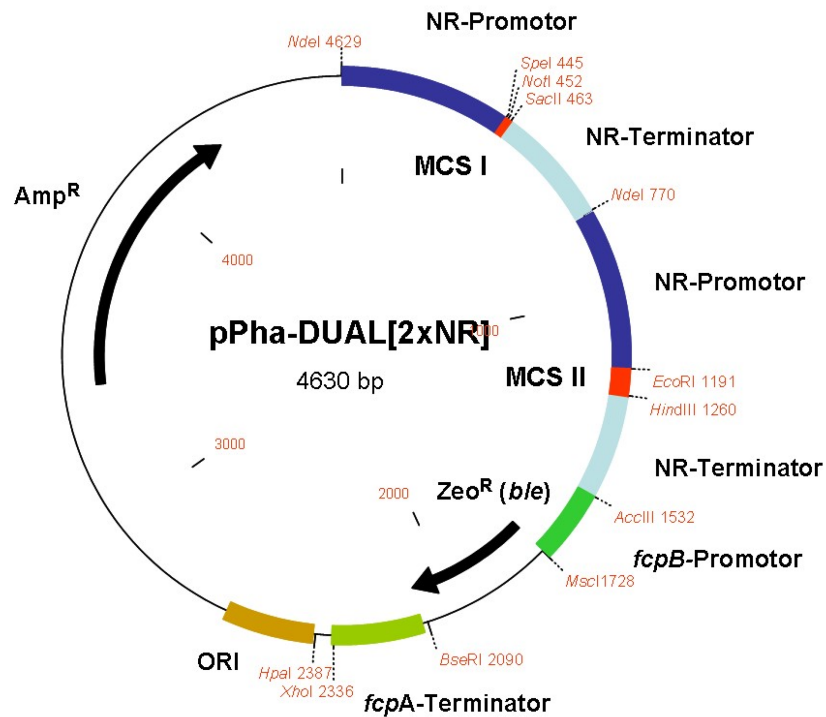
MPTISDHTHACRAANLASSPQRRMVLALLALCLSLVAPSVTAERPSTPPAVRSSVFVSSRTKISWADASSRRKQIL
LGMSDNKNDSPVDRKPASEPGLKASLRNKWEDETPASEPDAGFLEGIKRWFNSDEGREVDKTYFISLFLALLLR
TIIEPRFIPSLSMYPTFEVGDQLAVEKVTKRIFKPYRTEVVVFQPPQAFRDIVENQYGDKSKGKEALIKRIVAVE
GDKVEIKNGKLLINDIEQEEAYTAEDAQYAFGPVRVPPENVLVLGDNRNHSLDGHIWGFLPTKNVIGRAVFVYWP
PWRVGNNGMF

A.thaliana :	MMVMISLH	ESTPPLAFLKSDSN	-----SRFLKNPNPNFIQFTP	-----	: 38
P.tricornu :	-MPTISDHTHACRAANLASSPQRRMVLALLALCLSLVAPSVTAERPSTPPA				: 49
A.thaliana :	-KSQLLFPQRLNFNTGTNLNRRTLSCYGIKDSSE	--TTKSAPSLDSDGGG			: 85
P.tricornu :	VRSSVEVSSRTKISWADASSRRKQILGMSDNKNDSPVDRKPASEEGLKA				: 99
A.thaliana :	GGDGGDDDKGEVEEKNRLFPEWLD	--FTSD	----DAQTVFVAIAVSLAFR		: 129
P.tricornu :	SLRNKWEDETPASEPDAGFLEGIKRWFNSDEGREVDKTYFISLFLALLLR				: 149
A.thaliana :	YFIAEPRIYPSLSMYPTFDVGDRLVAEKVSYYFRKPCANDIVIFKSPEVL				: 179
P.tricornu :	ETIIEPRFIPSLSMYPTFEVGDQLAVEKVTKRIFKPYRTEVVVFQPPQAF				: 199
A.thaliana :	QEVGY	-----TDADVFIKRIVAKEGDLVEVHNGKLMVNGVARNEKFI			: 222
P.tricornu :	RDIVENQYGDKSKGKEALIKRIVAVEGDKVEIKNGKLLINDIEQEEAYTA				: 249
A.thaliana :	EPPGYEMTPIRVPENSFVVMGDNRRNNSYDSHVWGPLPLKNIIGRSVFRYW				: 272
P.tricornu :	EDAQYAFGPVRVPPENVLVLGDNRNHSLDGHIWGFLPTKNVIGRAVFVYWP				: 299
A.thaliana :	PPNRVSGTVLEGGCAVDKQ				: 291
P.tricornu :	PPWRVG	----NGGMF	----		: 310

Abb. 10-1: Proteinsequenzen der beiden pl-SP1-Homologen aus *P. tricornutum* und *A. thaliana* und das entsprechende Aminosäurealignment

In den Proteinsequenzen sind die vorhergesagten Transitpeptide (rot) und das vorhergesagte Signalpeptid (blau) markiert. Der eigentliche Signalpeptidase 1-homologe Bereich liegt im Alignment ~ bei Position 120.

10.4 Vektorkarten



pPha-DUAL[2xNR] Derivat von pPha-T1 (Acc.Nr.: AF219942)

NR-Promotor:

Intergenische Sequenz 5' des Nitratreduktase-Gens von *P. tricornutum*
(Chromosom 20, 363018-363286)

NR-Terminator:

Intergenische Sequenz 3' des Nitratreduktase-Gens von *P. tricornutum*
(Chromosom 20, 366341-36658)

Abb. 10-2: Vektorkarte von pPha-Dual_{2xNR}

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Uwe Maier für das interessante und herausfordernde Thema, das er mir zur Promotion geboten hat. Damit verbunden danke ich ihm für seine ständige Diskussionsbereitschaft, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und, nicht zuletzt, für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die Finanzierung dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Klaus Lingelbach für seine Bereitschaft, die Zweitkorrektur für diese Arbeit zu übernehmen, sowie den übrigen Mitgliedern der Prüfungskommission Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und Herrn Prof. Dr. Andreas Brune.

Ich danke der DFG Graduiertenschule 1216 „Intra- and Intercellular Transport and Communication“, in deren Rahmen diese Arbeit entstanden ist, für die Finanzierung und die vielfältigen Angebote für Seminare, Workshops und Tagungen. Die Zeit in unserem „GraKo“ war, obwohl manchmal anstrengend, summa summarum sehr lehrreich und befruchtend. Damit einhergehend sei meinem *Advisory Board* im Graduiertenkolleg, Uwe Maier, Regine Kahmann, Renate Renkawitz-Pohl und Stefan Zauner für ihre wissenschaftlichen Beratungen und Hilfestellungen sowie Lucette Claudet für die exzellente administrative Betreuung des GraKos gedankt.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an die Kooperationspartner der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Schleiff in Frankfurt für die hervorragende Zusammenarbeit. Besonders danke ich Oliver Mirus für die Erstellung des dreidimensionalen Homologiemodells und die Berechnung des Stammbaums, sowie Rolf Bredemeier und Raimund Haar für die elektrophysiologischen Messungen an „unserem“ Omp. Ohne eure Beiträge, wäre diese Arbeit nicht, was sie ist!

Dr. Geoff Waldo (Los Alamos National Laboratories) danke ich für die Bereitstellung der *self-assembling split GFP-Templates*.

Mein Dank gilt auch den vielen Arbeitsgruppen am Fachbereich und am MPI, von deren Hilfeleistungen und Bereitstellung von Gerätschaften und Material ich in dieser Arbeit profitieren konnte, und zu denen sich im Laufe der Jahre freundschaftlich-kooperative Verbindungen ergeben haben: den AGs Batschauer, Bremer, Kahmann und Lingelbach.

Gedankt sei auch den zahlreichen Service-Bediensteten, die einem die Arbeit maßgeblich erleichtern, u.a. den Mitarbeitern der Elektronik- und Feinmechanikwerkstatt und den Betreuern des KLSM.

Heidemarie Thierfelder kümmerte sich um die Algenkulturen und -medien, und stellten diese für die Arbeiten im Labor zur Verfügung. Dafür danke ich.

Ein Dankeschön meinen Lektoren Melanie Abram und Stefan Zauner für das Korrekturlesen, für die konstruktive Kritik, und für die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Der gesamten Arbeitsgruppe Maier danke ich für zahlreiche Diskussionen, viele hilfreiche Tipps, und nicht zuletzt für das hervorragende Arbeitsklima und die vielen netten gemeinsamen Stunden.

Last but not least möchte ich ganz herzlich meiner ganzen Familie danken, die mich auf meinem Weg stets begleitet und unterstützt hat.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Lars Bullmann
geboren am 25. Mai 1981
in Velbert

Schulbildung

1991 – 2000 Geschwister-Scholl-Gymnasium Velbert
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

2000 – 2001 Heilpädagogische Kindertagesstätte „Im Tüschchen“
Heiligenhaus

Hochschulausbildung

2001 – 2006 Philipps-Universität Marburg
Studium der Biologie mit den Hauptfächern
Zellbiologie, Genetik und Parasitologie

2006 – 2007 Philipps-Universität Marburg
Diplomarbeit im Fach Zellbiologie
„Charakterisierung des Nukleomorph-codierten hypothetischen
Proteins Orf228 der Cryptophyte *Guillardia theta*“

Promotion

2007 – 2010 Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Biologie
-Zellbiologie-
Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe G. Maier
über „ptOmp85 – ein Toc75-Homolog in der dritten
Plastidenmembran von *Phaeodactylum tricornutum*“.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„ptOmp85 – ein Toc75-Homolog in der dritten Plastidenmembran von *Phaeodactylum tricornutum*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg an der Lahn, den 11.01.2010